

Funktionell-genomische Untersuchungen am Fibroblastenwachstumsfaktor BRANCHLESS in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Boris Adryan
aus Mainz

1. Referent: PD Dr. Reinhard Schuh.....
2. Referent: Prof. Dr. Hans-Henning Arnold.....
eingereicht am: 04. September 2004.....
mündliche Prüfung (Disputation) am: 15. Dezember 2004

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Adryan, B. und Schuh, R.: Gene Ontology-based clustering of gene expression data. Bioinformatics, Online-Vorveröffentlichung am 29. April 2004.

Dammai, V., Adryan, B., Lavenburg, K. und Hsu, T.: *Drosophila awd*, the homolog of human *nm23*, regulates FGF receptor levels and functions synergistically with *shi/dynamin* during tracheal development. Genes & Development 17: 2812-2824 (2003).

Tagungsbeiträge

Adryan, B., Stahl, M. und Schuh, R.: Gene expression profiling of tracheal terminal cells. (Poster) Annual *Drosophila* Conference, Washington, DC, USA (2004)

Adryan, B., Stahl, M. und Schuh, R.: Gene expression analysis of the Branchless/FGF signalling cascade in *Drosophila*. (Poster) European *Drosophila* Research Conference, Göttingen (2003)

Adryan, B. und Schuh, R.: Gene expression analysis and *Drosophila* tracheal development in hypoxia. (Vortrag) EMBO Practical Course *Functional genomics using high-density oligonucleotide arrays*, Universitätsklinik Aarhus, Dänemark (2002)

Dammai, V., Adryan, B., Lavenburg, K. und Hsu, T.: *Drosophila* VHL interacts with cytoskeletal components and regulates egg chamber development. (Poster) Annual *Drosophila* Conference, San Diego, CA, USA (2002)

Lavenburg, K., Adryan, B. und Hsu, T.: Functional study of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in the developing *Drosophila* tracheal system. (Poster) Annual *Drosophila* Conference, Washington, DC, USA (2001)

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2001 bis September 2004 am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie (Göttingen) in der Abteilung von Prof. Dr. Herbert Jäckle in der Arbeitsgruppe von Privatdozent Dr. Reinhard Schuh angefertigt.

Bei Herrn Dr. R. Schuh möchte ich mich für das ehrgeizige Forschungsthema bedanken, ebenso bei Herrn Prof. Dr. Hans-Henning Arnold für die Fachvertretung an der Fakultät für Biowissenschaften und Psychologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Mein Dank gilt Reinhard für seine fortwährende Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und vor allem sein in mich gesetztes Vertrauen und die Freiheit, das Projekt immer wieder in neue Richtungen zu lenken. Die Entlastung durch seinen handwerklichen Einsatz gerade bei der Fliegenarbeit ließen mir die Zeit, meine Fähigkeiten neben der Entwicklungsbiologie auch noch in der Bioinformatik weiterzuentwickeln. Auch meine Kenntnisse über die *Die Hard*-Trilogie, die Fußball-Bundesliga und die regelmäßige Pflege des *Roihessisch* und *Frankfurterisch* habe ich ihm zu verdanken.

Eine große Hilfe bedeutete die technische Assistenz von Dr. Markus Stahl, insbesondere die schier unendliche Liste an *in situ*-Hybridisierungen wäre ohne ihn bis heute noch nicht abgearbeitet. Dem Dank schließe ich die besten Wünsche für seine Zukunft bei der Facharztausbildung an.

Bei Ho-Ryun Chung möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft bei statistischen Fragen und praktische Hilfestellungen mit seinem Linux-System bedanken, bei Dr. Ralf Pflanz für deutlich ausgesprochene Kritik, Tipps und Tricks bei der Mikroskopie und sein riesiges Angebot an Laborreagenzien und Rotweinen. Für „abteilungsweiten Service“ aller Art bedanke ich mich bei Prof. Dr. H. Jäckle, Dr. Ulrich Nauber, Gordon Dowe und Ursula Jahns-Meyer

Besonders dankbar bin ich Prof. Dr. Tien Hsu an der Medical University of South Carolina in Charleston, USA, für unsere fortwährende Kooperation und Freundschaft. Auch allen anderen Wissenschaftlern, die zum Fortgang der Arbeit beigetragen haben, danke ich für die freundliche Überlassung von Arbeitsmaterialien und Informationen. Großer Dank gebührt Frau Dr. Claudia Stückl am Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen und Herrn Dr. Ralph Pirow am Institut für Zoophysiologie der Universität Münster für die Betreuung bei den biophysikalischen und optophysiologischen Messungen.

Mein Dank geht auch an alle anderen Kollegen im Labor und in der Abteilung für das zumeist friedvolle Zusammenleben und soziale Interaktionen auch über den Laboralltag hinaus. Besonders danke ich meinen Mitläufern Aaron Voight und Peter Karsten im Marathon-Team *Drosophila Breathless* für Trainingsmotivation, keiner kann das Trainingsprinzip *Saufen und Laufen* so erfolgreich umsetzen...

Abschließend geht mein herzlichster Dank an meine Mutter, meine Freunde, und besonders Ilka für die fortwährende Unterstützung, aufmunternde Worte und Verständnis, wenn nicht nur das Projekt schwierig war...

Die Arbeit wurde unterstützt durch Stipendien des Fonds der Chemischen Industrie, des Bundesministeriums für Bildung und Forschung, *e-fellows.net* und der Lutz E. Adolf-Stiftung für Hochbegabte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Fibroblastenwachstumsfaktor ist ein hochkonserviertes Signalmolekül	3
1.1.1	Die Homologen des Fibroblastenwachstumsfaktors in der Fruchtfliege	9
1.1.2	Multiple Rollen von <i>Drosophila</i> BRANCHLESS	11
1.2	Branchless ist essentiell für die Entwicklung des Tracheensystems von <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.2.1	Die Morphogenese und Morphologie des Tracheensystems	12
1.2.2	Genetische Mechanismen der Verzweigungsmorphogenese	14
1.3	Funktionelle Genomik und Bioinformatik ermöglichen die genomweite Analyse des Transkriptoms	18
1.3.1	Die Fruchtfliege ist ein günstiges Modelltier für bioinformatische Analysen	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Ergebnisse	23
2.1	Morphologische Analyse der Missexpression von <i>branchless</i>	23
2.1.1	Betrachtung des Tracheensystems in der Funktionsverlust-Mutanten <i>bnl^{P1}</i> und in der Überexpression	23
2.1.2	Die Überexpression von <i>branchless</i> induziert tracheale Terminalzellidentität in fast allen Tracheenzellen	28
2.1.3	Die Überexpression von BRANCHLESS in Tracheenzellen ist letal	29
2.1.4	Nach Überexpression von BRANCHLESS in den Tracheenzellen erfolgt keine tracheale Gasfüllung	30
2.2	Transkriptomanalysen	34
2.2.1	Qualitätskontrolle	35
2.2.2	Verschiedene statistische Verfahren identifizieren differentiell repräsentierte Gene im Vergleich von Experimenten	36
2.3	Bioinformatische Methodenentwicklung und Anwendung auf die Messdaten	47
2.3.1	Überlegungen zur Identifikation trachealer Gene mittels statistischer Verfahren	47
2.3.2	GO-Cluster identifiziert differentiell repräsentierte Gene nach ihrer Annotation in der <i>Gene Ontology</i> -Datenbank	49
2.3.3	Die graphische Repräsentation von Messwerten in Signalnetzwerken bestätigt die Aktivierung mehrerer Signalkaskaden	56
2.3.4	Die Datenbankanalyse identifiziert die chromosomale Lokalisation gekoppelter transkriptioneller Aktivität	58
2.3.5	Die Projektion von Genexpressionsdaten auf biochemische und genetische Interaktionen verdeutlicht komplexe Zusammenhänge des Zellgeschehens	63
2.4	Die Überprüfung der Genexpression durch <i>in situ</i> -Hybridisierung in fixierten Embryonen von <i>Drosophila</i> bestätigt die Ergebnisse der Transkriptomanalyse	68
2.4.1	Die am auffälligsten regulierten Gene werden im Fettkörper exprimiert	68
2.4.2	Einige Kandidaten sind spezifisch für das Tracheensystem von <i>Drosophila</i>	69
2.5	Identifikation eines neuen Gens der trachealen Morphogenese durch Kombination von Transkriptomanalyse und einer 2-Hybrid-Untersuchung	72
2.6	Die Aktivierung der Stickstoffmonoxid-Signalkaskade durch BRANCHLESS konnte nicht bestätigt werden	74
3	Diskussion	83
3.1	Durch Überexpression von BRANCHLESS differenzieren fast alle Zellen des Tracheensystems zu Terminalzellen	83
3.2	Die in den Missexpressionssituationen auftretende Letalität in den frühen Larvalstadien könnte Resultat einer fehlenden Sauerstoffversorgung des Gewebes sein	84
3.3	Die Transkriptomanalyse verschiedener <i>bnl</i> -Genotypen liefert kontrovers zu interpretierende Daten	86
3.3.1	Grenzen der Technik und Limitationen durch experimentelles Design	86
3.3.2	Über die Notwendigkeit von Replikaten	87
3.4	Das Gen <i>branchless</i> wird nicht durch den Hypoxie-abhängigen Transkriptionsfaktor SIMILAR reguliert	88

3.5	Die Überexpression von BRANCHLESS aktiviert Gene mit putativer Immunfunktion	90
3.5.1	Mögliche Gründe für die Aktivierung der Immunantwort nach Überexpression von BNL	91
3.6	Restriktionen im experimentellen Design erfordern aufwendige bioinformatische Analysen	93
3.6.1	Darstellung der Messdaten im Kontext funktioneller Annotationen	94
3.6.2	Abbildung der Messdaten auf die chromosomale Lokalisation	95
3.6.3	Die Überexpression von BRANCHLESS induziert eine Reihe unterschiedlicher Signalkaskaden.	96
3.7	Es gibt spezifische Zielgene für BRANCHLESS im Tracheensystem	97
3.7.1	Gene ohne Annotation.	97
3.7.2	Gene mit Annotation aufgrund von Sequenzähnlichkeit.	97
3.7.3	Gene mit bekannter Funktion im Tracheensystem und anderen Organen.	98
3.8	Die Stickstoffmonoxid-Signalkaskade hat tracheale Funktionen, die von <i>Branchless</i> unabhängig sind	101
3.9	Kritische Würdigung und Ausblick	102
4	Material und Methoden	105
4.1	Arbeit mit Fruchtfliegen	105
4.1.1	Benutzte Fliegenstämme und Genetik	105
4.1.2	Keimbahntransformation	107
4.1.3	Begasung mit N ₂ /O ₂ -Gemischen	107
4.2	Färbetechniken und Mikroskopie	108
4.2.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung	108
4.2.2	Immunfärbung	111
4.2.3	TUNEL-Test zum Nachweis apoptotischer Zellen	112
4.2.4	Farbstoffapplikation durch Injektion oder Permeabilisierung	112
4.2.5	Konventionelle Mikroskopie	113
4.2.6	Konfokale Laserscan-Mikroskopie	113
4.2.7	Optophysikologie	114
4.3	Genexpressionsanalysen mit dem Affymetrix <i>GeneChip</i> -System	114
4.3.1	Probenaufbereitung aus embryonalem Gewebe	115
4.3.2	Hybridisierung, Wasch- und Färbeschritte und Bilderfassung	116
4.3.3	Computergestützte Analysen von Microarray-Daten	116
4.4	Molekular- und mikrobiologische Arbeitstechniken	119
4.4.1	Klonierungen	119
4.4.2	Zwei-Hybrid-Untersuchungen	121
4.4.3	<i>in vitro</i> -Transkription	122
4.4.4	Hybridisierung an membrangebundene Nukleinsäuren	122
4.4.5	Letalitätstest nach bakterieller Expression putativ antimikrobieller Peptide	123
4.5	Zellkulturtechnik	123
4.5.1	Transfektion	123
4.6	Nachweismethoden für das Stickstoffmonoxid-Radikal	123
4.6.1	Visualisierung mittels 4,5-Diaminofluorescein	124
4.6.2	NADPH-Diaphorasefärbung	124
4.6.3	Nitrit/Nitrat-Nachweis mit Griess'schem Reagenz	124
4.6.4	Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie)	124
5	Literaturverzeichnis	126
6	Tabellenwerk	142
6.1	Filterergebnisse nach Expressionswertbestimmung mit dem Verfahren der MASv5	142
6.2	Filterergebnisse nach Expressionswertbestimmung mit dem Verfahren von Naef	158
6.3	Gemeinsame Kandidaten aus der SAM-Analyse	173
7	Zusammenfassung	177

0 Konventionen zur vorliegenden Arbeit

Rechtschreibung. Die vorliegende Arbeit orientiert sich an den modifizierten Rechtschreibregeln der Wochenzeitung *Die Zeit*, siehe <http://www.zeit.de/zeitschreibung>.

Abkürzungen. Im Abkürzungsverzeichnis sind nur solche Abkürzungen und ihre Erklärung aufgeführt, die laut Duden nicht dem allgemeinen Sprachgebrauch entnommen sind oder laborübliche physikalische Einheiten darstellen.

ANOVA	Varianzanalyse	LB	Luria-Bertani-Medium
ATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat	LED	Leuchtdiode
BAC	künstliches bakterielles Chromosom	MASv5	<i>Microarray Suite</i> Version 5
bp	Basenpaare	mRNA	Boten-RNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NADPH	Nicotinamidadenosinphosphat
CA	Komponentenanalyse	NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
cDNA	komplementäre DNA	OD	optische Dichte
cRNA	copy RNA	P	im Zusammenhang mit
DAF	4,5-Diamonofluorescein		Säugetierentwicklung: Tag nach
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>		Geburt
dbEST	<i>dbExpressed Sequence Tags</i>	PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
DDAB	Dimethyldioctadecylammonium-Bromid	PBT	PBS mit Tween-20
DIG	Digoxygenin	PCA	Hauptkomponentenanalyse
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	PCR	Polymerasekettenreaktion
E	im Zusammenhang mit Säugetierentwicklung: Tag der Embryonalentwicklung	PDB	Proteinstrukturdatenbank
ESR	Elektronenspinresonanz	pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
EST	Teil einer cDNA	p-Wert	Wahrscheinlichkeitswert
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	RAS-GAP	RAS-GTPase aktivierendes Protein
FLUO	Fluorescein	SAM	Signifikanzanalyse für <i>Microarrays</i>
GAL4	Hefetranskriptionsfaktor	SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
GFP	grünfluoreszierendes Protein	siRNA	kleine interferierende RNA
GIF	<i>graphics interchange format</i>	SSC	Dinatriumcitrat-Puffer
GO	<i>Gene Ontology</i>	TIF	<i>tagged image file</i>
<i>GOid</i>	GO-Identifikationsnummer	TSA	<i>Tyramide-Signal-Amplifier</i>
kb	Kilobasenpaare	TUNEL	terminal desoxyribosyl-transferase mediated dUTP nick end labelling; terminale Desoxyribosyltransferase vermittelte dUTP-Strangbruch-Markierung
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>	UAS	Aktivierungsessequenz für GAL4
Ko-IP	Koimmunoprecipitation	UDP	Uridinphosphat
		VnN	Verfahren nach Naef
		ZNS	Zentralnervensystem

Schreibweise von Gennamen, Genprodukten und Mutanten. Gemäß der Konventionen der Datenbank FlyBase (<http://www.flybase.org/docs/nomenclature/lk/nomenclature.html>) werden Gene und ihre mRNA *kursiv* geschrieben. Normalerweise beginnen rezessive Gene mit kleinen und dominante Gene mit großen Anfangsbuchstaben. Aufgrund einer Vielzahl uncharakterisierter Gene wurde von dieser Regel in der vorliegenden Arbeit generell Abstand genommen. Genprodukte beginnen immer mit Großbuchstaben und werden mit KAPITÄLCHEN geschrieben. Bei generell großgeschriebenen Abkürzungen von Gennamen wie FGF oder CG12345 wird auf eine Anpassung der Schreibweise nach der genetischen Nomenklatur verzichtet. Ob es sich dabei um das Gen oder das entsprechende Protein handelt, geht aus dem Zusammenhang hervor. Ebenso können sowohl Gene als auch Proteine exprimiert werden.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird bei Auflistungen von Kandidaten aus der Analyse zumeist die offizielle Abkürzung für das Protein des entsprechenden Gens für das *Probeset* genannt. Bei der Nennung der Kandidaten wäre es formal richtig, zunächst nur von der differentiellen Regulation der Probesets zu sprechen, und erst bei der biologischen Interpretation die entsprechenden Gene und Transkripte, und schließlich das funktionsvermittelnde Protein zu nennen. Dieses Vorgehen ist für die Vielzahl von Kandidaten aber eher hinderlich.

Im Allgemeinen werden Gen- und Proteinnamen abgekürzt, einen Schlüssel für die in der Arbeit benutzten Gene bietet nachfolgende Tabelle.

	<i>actin 5C</i>	<i>cycA</i>	<i>cyclin A</i>
	<i>gasp</i>	<i>cycB3</i>	<i>cyclin B3</i>
	<i>globin</i>	<i>cycE</i>	<i>cyclin E</i>
	<i>med21</i>	<i>dah</i>	<i>discontinuous actin hexagon</i>
	<i>thor</i>	<i>dl</i>	<i>dorsal</i>
	<i>wee</i>	<i>dl</i>	<i>delta</i>
	RAC1	<i>DOF, stumps,</i>	<i>downstream of FGF</i>
	RAF	<i>heartbroken</i>	
aFGF	acidic FGF	<i>dome</i>	<i>domeless</i>
<i>aft</i>	<i>adrift</i>	<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
<i>ago</i>	<i>archipelago</i>	<i>drf</i>	<i>drifter</i>
<i>akt</i>	<i>protein kinase B</i>	<i>drk</i>	<i>downstream of receptor kinase</i>
<i>alp23B</i>	<i>activin like protein at 23B</i>	<i>dro5</i>	<i>drosomycin 5</i>
<i>aop, yan</i>	<i>anterior open</i>	<i>drs</i>	<i>drosomycin</i>
<i>arm</i>	<i>armadillo</i>	<i>dSOR</i>	<i>downstream of raf</i>
<i>awd</i>	<i>abnormal wing discs</i>	<i>dsx</i>	<i>doublesex</i>
<i>axn</i>	<i>axin</i>	EGF	<i>epidermal growth factor</i>
<i>bcd</i>	<i>bicoid</i>	<i>egl</i>	<i>egg laying defective</i>
bFGF	basic FGF	EPO	<i>erythropoietin</i>
<i>bnl</i>	<i>branchless</i>	ERK	<i>extracellular signal-regulated</i>
<i>btl</i>	<i>breathless</i>		<i>kinase</i>
<i>cact</i>	<i>cactus</i>	<i>esg</i>	<i>escargot</i>
<i>cno</i>	<i>canoe</i>	FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
<i>croc</i>	<i>crocodile</i>	FGFR	FGF-Rezeptor
<i>csw</i>	<i>corkscrew</i>	<i>for</i>	<i>foraging</i>

FRS2	<i>FGFR stimulated 2 Grb2 binding protein</i>		61F
<i>fzy</i>	<i>fizzy</i>	<i>put</i>	<i>punt</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	<i>pyr</i>	<i>pyramus</i>
<i>gish</i>	<i>gilgamesh</i>	RAS	<i>ras oncogene</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>	<i>ras85D</i>	<i>ras oncogene at 85D</i>
<i>gro</i>	<i>groucho</i>	<i>retn</i>	<i>retained</i>
<i>hdc</i>	<i>headcase</i>	<i>rho</i>	<i>rhomboid</i>
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>	<i>rib</i>	<i>ribbon</i>
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>	<i>rl</i>	<i>rolled</i>
<i>hop</i>	<i>hopscotch</i>	<i>robo</i>	<i>roundabout</i>
HS6ST	<i>heparansulfat-6-O-sulfotransfase</i>	<i>s</i>	<i>star</i>
<i>htl</i>	<i>heartless</i>	<i>sal</i>	<i>spalt</i>
IGF	<i>insulin-dependent growth factor</i>	<i>scrib</i>	<i>scribbled</i>
<i>im1</i> , CG18108	<i>immune induced molecule-1</i>	<i>sev</i>	<i>sevenless</i>
<i>im10</i> , CG18279	<i>immune induced molecule-10</i>	<i>sfl</i>	<i>sulfateless</i>
<i>im3</i> , CG16844	<i>immune induced molecule-3</i>	<i>sgl</i>	<i>sugarless</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>	<i>shg</i>	<i>shotgun</i>
<i>kel</i>	<i>kelch</i>	<i>shh</i>	<i>sonic hedgehog</i>
<i>kni</i>	<i>knirps</i>	<i>shot</i>	<i>short stop</i>
<i>knrl</i>	<i>knirps-related</i>	SHP2	<i>src homology 2 phosphatase</i>
let	<i>lethal</i>	<i>sima</i>	<i>similar</i>
<i>lola</i>	<i>longitudinals lacking</i>	<i>sli</i>	<i>slit</i>
<i>lysE</i>	<i>lysozym E</i>	<i>smg</i>	<i>smaug</i>
<i>mad</i>	<i>mothers against dpp</i>	<i>sna</i>	<i>snail</i>
<i>mael</i>	<i>maelstrom</i>	<i>snr1</i>	<i>snf5-related 1</i>
<i>map60</i>	<i>microtubule-associated protein 60</i>	SOS	<i>son of sevenless</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	<i>spi</i>	<i>spitz</i>
<i>mcm7</i>	<i>minichromosome maintenance 7</i>	<i>sqh</i>	<i>spaghetti squash</i>
<i>mega</i>	<i>megatrachea</i>	<i>src</i>	<i>src oncogene</i>
<i>mfas</i>	<i>midline fasciclin</i>	SRF	<i>serum response factor</i>
<i>mmp1</i>	<i>matrix metalloproteinase 1</i>	STAT-1	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
<i>mof</i>	<i>males absent on the first</i>		<i>signal transducers and activators of transcription at 92E</i>
<i>mor</i>	<i>moira</i>	<i>stat92E</i>	<i>sprouty</i>
<i>msl-3</i>	<i>male sex lethal-3</i>	<i>sty</i>	<i>suppressor of variegation205</i>
<i>n</i>	<i>notch</i>	<i>Su(var)205</i>	<i>tantalus</i>
<i>nap1</i>	<i>nucleosome assembly protein 1</i>	<i>tan</i>	<i>trachea defective</i>
<i>nej</i>	<i>nejire</i>	<i>tdf</i>	<i>transforming growth factor</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>	TGF	<i>tango</i>
<i>pfe</i>	<i>pray for elves</i>	<i>tgo</i>	<i>thisbe</i>
PGRP-LE	<i>peptidoglycan recognition protein LE</i>	<i>ths</i>	<i>thickveins</i>
<i>pim</i>	<i>pimples</i>	<i>tkv</i>	<i>toll</i>
<i>pka-R1</i>	<i>cAMP-dependent protein kinase R1</i>	<i>tl</i>	<i>trachealess</i>
<i>pnr</i>	<i>panier</i>	<i>trh</i>	<i>trithorax</i>
<i>pnt</i>	<i>pointed</i>	<i>trxG</i>	<i>twine</i>
<i>prx2540-2</i>	<i>peroxiredoxin 2540</i>	<i>twe</i>	<i>twist</i>
<i>ptp61F</i>	<i>protein tyrosine phosphatase</i>	<i>twi</i>	<i>unplugged</i>
		<i>unpg</i>	<i>unpaired</i>
		<i>upd</i>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
		VEGF	<i>von Hippel-Lindau</i>
		<i>vhl</i>	<i>white</i>
		<i>w</i>	<i>wingless</i>
		<i>wnt</i>	<i>yippee interacting protein 7</i>
		<i>yip7</i>	

Nenikikamen!
Pheidippides, 490 vor Christus
in: Die Geschichten des Herodot, Buch VI

1 Einleitung

Nenikikamen – Wir haben gesiegt. Mit diesen Worten und dem tragischen Tod des Boten endet die athletischste Nachrichtenübermittlung der Geschichte, nachdem der griechische Läufer Pheidippides um 490 vor Christus von Marathon nach Athen gelaufen war, um vom Sieg über die Perser zu berichten. Die Perserkriege haben sicherlich stattgefunden. Und dennoch ist es zweifelhaft, ob sich diese Geschichte tatsächlich so zugetragen hat. Nach einer anderen Überlieferung des Herodot von Halikarnassos, der als Vater der wissenschaftlichen Geschichtsschreibung gilt, überbrachte Pheidippides einen verzweifelten Hilferuf der Athener nach Sparta. Dass er dabei jedoch ausgerechnet Hirtengott Pan getroffen hat, fördert nicht unbedingt die Glaubwürdigkeit dieser Fassung.

Die Frage nach der Richtung einer Signalübertragung und ihren funktionellen Elementen Sender, Vermittler und Empfänger ist universell. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Vermittlern und Empfängern der zellulären Signaltransduktion durch funktionell-genomische Untersuchungen am Fibroblastenwachstumsfaktor *BRANCHLESS* in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*.

Zur anschaulichen thematischen Einordnung des Themas soll zunächst eine Übersicht über die biologische Signalübertragung in Tieren gegeben werden. Ein Hauptmerkmal der Eumetazoen ist die strikte Trennung zwischen generativen und unterschiedlichen somatischen Zelltypen, die zumeist in spezialisierten Geweben organisiert sind. Dabei agieren Zellen und Gewebe nicht gänzlich autonom; vielmehr stehen sie untereinander in komplexen Wechselbeziehungen, die den Austausch von Signalen erfordern. Die notwendigen Signalstoffe leiten sich als chemische Mediatoren oftmals von Metaboliten ab, die auf intrazellulärer Ebene über Prinzipien der Substrataktivierung oder Substrathemmung agieren und im Verlauf der Evolution für die Signalübertragung institutionalisiert wurden. Während Aminosäurederivate die einfachsten Signalstoffe darstellen und hauptsächlich als Neurotransmitter für die akute und schnelle Signalübertragung fungieren, entstanden in allen Stämmen zusätzlich genomkodierte Proteinfamilien, die für komplexere Regulationsprozesse wie die hormonelle Kontrolle oder während der Morphogenese wichtig sind.

Hormone wirken hauptsächlich endokrin und spielen auf der organismischen Ebene beispielsweise in Vertebraten eine Rolle, wo spezialisierte Sender- und Empfängergewebe über Körperhöhlen und Blutgefäßsysteme in komplexer Beziehung stehen. Sie wirken kurz- und langfristig und bilden das Hauptregelsystem der adulten Homöostase, die neben metabolischen und morphologischen

Funktionen sogar bestimmte Aspekte des Verhaltens umfasst. Es seien hier nur exemplarisch das zuweilen krankheitsrelevante Insulin im Glukosestoffwechsel oder als besonders vielschichtiges Beispiel der Sexualzyklus weiblicher Mammalia genannt, der über das hypothalamo-hypophysäre System gesteuert wird.

Der gewebsübergreifenden homoiostatischen Wirkung der Hormone steht die der parakrin agierenden Wachstumsfaktoren gegenüber. Sie werden vor allem während der Entwicklung zeitlich dynamisch und nach definierten genetischen Programmen exprimiert und tragen als lokal wirkende Signale an die zelluläre Umgebung zur Gestaltbildung der Tiere bei. In Abhängigkeit vom biologischen Kontext können Wachstumsfaktoren über spezielle Rezeptoren in Zielzellen eine Vielzahl von Reaktionen auslösen. Die Spannweite der zellulären Antworten reicht von minimalen morphologischen Veränderungen (z.B. der Ausbildung zellulärer Extensionen wie Filopodien) über die Aktivierung bestimmter physiologischer oder metabolischer Programme (z.B. durch die weitere Ausdifferenzierung in spezialisierte Zelltypen wie Neuronen oder Drüsenzellen) bis hin zur Proliferation oder der Apoptose der Zellen.

Wachstumsfaktor (englisch: <i>growth factor</i>)	gebräuchliches Kürzel	allgemeine Funktion
epidermal... <i>epidermal</i>	EGF	Proliferation verschiedener Zelltypen
Fibroblasten- <i>fibroblast-</i>	FGF	Proliferation, Differenzierung und Migration verschiedener Zelltypen
insulinartiger... <i>insulin-like</i>	IGF	Stimulation des zellulären Metabolismus
Nerven- <i>nerve-</i>	NGF	Differenzierung von Nervenzellen, Auswachsen von Axonen und Dendriten
transformierender... <i>transforming</i>	TGF	Modulation der Wirkung anderer Wachstumsfaktoren, Induktionssignal während der Entwicklung
vaskulär-endothelialer... <i>vascular-endothelial</i>	VEGF	Proliferation, Differenzierung und Migration von Blutgefäßendothel
Erythropoietin	EPO	Proliferation und Differenzierung von Erythrozyten

Tabelle 1: Eine Übersicht über ausgewählte Proteinwachstumsfaktoren (modifiziert nach Alberts et al., 2002). Viele dieser Faktoren wurden nicht zuletzt wegen ihrer fundamentalen Bedeutung für die Entwicklungsbiologie und viele pathophysiologische Prozesse im Menschen intensiv erforscht und sind daher einem breiten Fachpublikum bekannt. Die meisten dieser Faktoren definieren eigene Proteinfamilien mit einer ebenso großen Varietät an Rezeptoren, die evolutionär hochkonserviert sind. Das Erythropoietin ist ein Peptidhormon, dass aufgrund seiner Wirkung oftmals als Proteinwachstumsfaktor diskutiert wird.

Die Proteinwachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren sind mannigfaltig. **Tabelle 1** zeigt exemplarisch nur einige der bekannteren Vertreter aus Vertebraten. Vielfach handelt es sich hierbei nicht nur um einen einzigen Wachstumsfaktor mit einem einzigen Rezeptor, sondern um Proteinfamilien ähnlicher Faktoren mit Homologie in Sequenz und molekularer Wirkung. Diese Vielfalt an Wachstumsfaktoren mit ihren entsprechenden Rezeptoren sowie ihr konzertiertes Zusammenwirken ist notwendig für eine fein abgestimmte Reaktion auf verschiedene Entwicklungssituationen. Gerade die detaillierten Vorgänge und faktortypischen Unterschiede bei der

Signalübertragung und intrazellulären Weiterverarbeitung spielen eine wichtige Rolle für die zelluläre Reaktion. Dennoch ist der prinzipielle Wirkmechanismus bei allen Proteinwachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren gleich: Der Wachstumsfaktor wird zunächst von der Senderzelle in den Extrazellularraum sekretiert. An der Zielzelle wird er dann extrazellulär von seinem membranständigen Rezeptor gebunden. Daraufhin wird intrazellulär eine Kaskade von Reaktionen sekundärer Botenstoffe in Gang gesetzt, die letztlich spezifische Transkriptionsfaktoren aktivieren und im Zellkern für die Aktivierung von Genen führen. Welche Signalkaskade (englisch: *pathway*) benutzt und wie sie durch den Rezeptor aktiviert wird, hängt vom speziellen Fall ab. In Kapitel 1.1 wird eine solche Reaktion am Beispiel des Fibroblastenwachstumsfaktors genauer beleuchtet werden.

1.1 Der Fibroblastenwachstumsfaktor ist ein hochkonserviertes Signalmolekül

Proteinwachstumsfaktoren und andere Signalstoffe werden nicht erst seit der Verbreitung molekulargenetischer Werkzeuge studiert. Klassisch wurden in biochemischen Experimenten etwa Zellextrakte auf ihre Wirkung auf Zellen in Kultur hin überprüft. Aus der Hypophyse von Kälbern isolierte man so beispielsweise Hormone. Hierbei wurde festgestellt, dass unreine Präparationen zusätzlich über einen bis dato unbekannten Faktor verfügen, der die Proliferation von 3T3-Mausfibroblasten anregte (Armelin, 1973).

Im Jahre 1974 isolierte und beschrieb Denis Gospodarowicz erstmalig einen spezifischen Faktor, den er bei einer systematischen Analyse verschiedener Gewebe vor allem in Hirn und Hypophyse gefunden hatte und der in seiner Wirkung auf serumfreie Kulturzellen dem unbekannten Hypophysenfaktor ähnlich war (Gospodarowicz, 1974). Aufgrund seines basischen isoelektrischen Punkts wurde dieser später *basic fibroblast growth factor* (kurz: bFGF, auch FGF2) genannt, im Gegensatz zum sauren Fibroblastenwachstumsfaktor (kurz: aFGF, auch FGF1), der einige Jahre danach ebenfalls aus Extrakten der Hypophyse isoliert werden konnte (Gambarini und Armelin, 1982). Wie man heute weiß, sind FGF1 und FGF2 zueinander homolog; im Weiteren bezieht sich die Bezeichnung FGF auf alle Mitglieder der Proteinfamilie, nur Ausnahmen werden entsprechend gekennzeichnet. Den Autoren dieser ersten Artikel erschien FGF zunächst als ein interessantes Werkzeug zur Untersuchung des Zellzyklusgeschehens *in vitro*, doch konnten lange Zeit keine ausreichenden Mengen an reinem FGF für notwendige Charakterisierungen des Wachstumsfaktors gewonnen werden. Meilensteine in der molekularen Erforschung waren die Bestimmung der Primärsequenz (Esch et al., 1985), gefolgt von der ersten Genklonierung für FGF2 (Abraham et al., 1986) und eines FGF-Rezeptors (Lee et al., 1989). Die ersten Kristallstrukturen von FGF, die noch heute zum genaueren Verständnis der Bindungseigenschaften beitragen, wurden bald darauf veröffentlicht (Eriksson et al., 1991; Zhu et al., 1991).

Seit der ersten Publikation über FGF vor genau dreißig Jahren sind mittlerweile etwa 18.000 weitere Artikel und zahlreiche Buchkapitel zum Thema erschienen. Zur Orientierung dienen eine

Reihe ausführlicher Übersichtsartikel (Ornitz, 2000; Borland et al., 2001; Goldfarb, 2001; Ornitz und Itoh, 2001). Die generelle Funktionsweise von FGF sowie Kenntnis über seine fundamentale Bedeutung für die Entwicklungsbiologie oder in der humanen Pathogenese gehören mittlerweile zum Lehrbuchwissen. Die Spannweite aktueller Forschung reicht beispielsweise von der FGF22-Expression in murinen Haarfollikelkeratinozyten (Beyer et al., 2003) über die Rolle des FGF12 in der Humangenetik eines seltenen erblichen mentalen Retardierungssyndroms (Gecz et al., 1999) und die Notwendigkeit von Ceramiden für die FGF-Funktion in Zellkultur (Arena et al., 2002) bis hin zur thermodynamischen Betrachtungen der Denaturierung von Proteinen mit FGF-ähnlicher Struktur (Liu et al., 2002). Im Folgenden werden daher nur die für die vorliegende Arbeit relevanten Inhalte zusammengefasst.

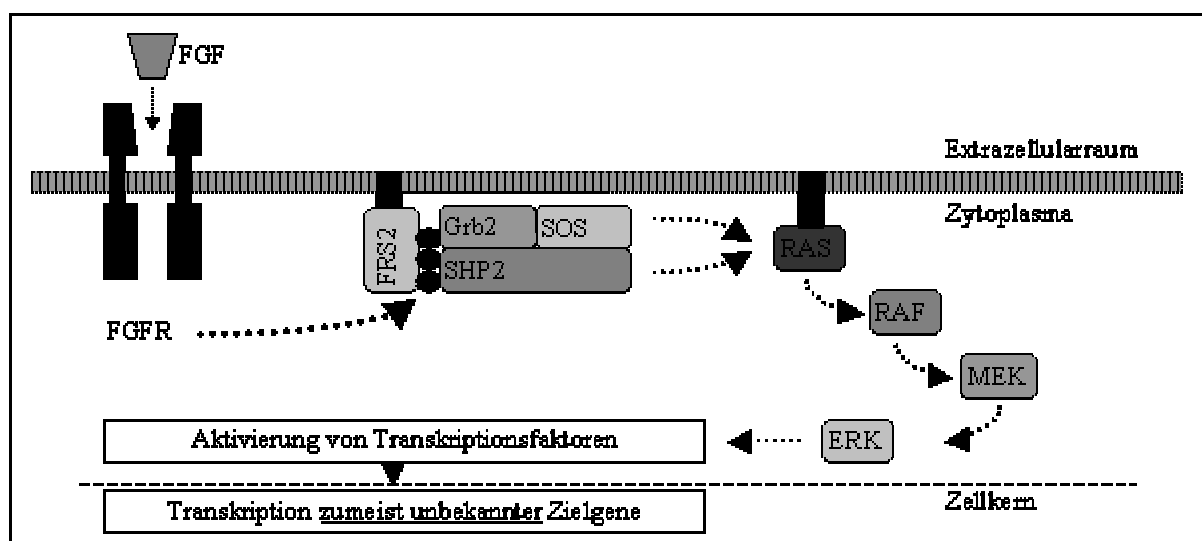


Abbildung 1: Aktivierung der Genexpression durch den Fibroblastenwachstumsfaktor (modifiziert nach Goldfarb, 2001). Die Bindung von FGF im Extrazellulärraum führt zur Dimerisierung von FGF-Rezeptoren (FGFR). Dies aktiviert ihre Kinasefunktion und führt nach Autophosphorylierung intrazellulär zur Phosphorylierung von FRS2 (FGFR STIMULATED 2 GRB2 BINDING PROTEIN), das seinem Namen entsprechend Grb2 (GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2) bindet und auch den Nukleotidaustauschfaktor SOS (SON OF SEVENLESS) sowie die Phosphatase SHP2 (SRC HOMOLOGY 2 PHOSPHATASE 2) rekrutiert. Dadurch kommt es zur Aktivierung von RAS, einem G-Protein, das eine Kaskade von Phosphorylierungen von RAF, MEK und dem namensgebenden ERK (EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE; auch: MAPK, MITOGEN-SCTIVATED PROTEIN KINASE) auslöst. Diese Kinase wiederum aktiviert spezifische Transkriptionsfaktoren, die dann im Zellkern zur Genexpression zumeist unbekannter Zielgene führen. Diverse organismusspezifische Ausnahmen sind hierbei allerdings möglich: So gibt es in *Drosophila* kein FRS2, dessen Funktion vermutlich vom Faktor DOF (DOWNSTREAM OF FGF) übernommen wird.

Signaltransduktion durch FGF-Rezeptoren: Genetische Studien an Vertebraten und Invertebraten sowie Versuche an Zellkultur zeigten, dass die durch FGF ausgelöste Signaltransduktion durch einen evolutionär hochkonservierten Mechanismus erfolgt (siehe **Abbildung 1**; zur Übersicht: Goldfarb, 2001). Dabei bindet FGF an seinen Rezeptor, eine transmembranständigen Rezeptortyrosinkinase. Es kommt zur typischen Dimerisierung und somit Aktivierung. Über Adaptermoleküle wird eine Signalkaskade ausgelöst, die nach der letzten Komponente ERK

(EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE) einer Kette von Kinasen benannt ist. Nach der Phosphorylierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren durch aktiviertes ERK werden diese im Zellkern aktiv und es kommt zur Expression von bis heute zumeist unbekannten Zielgenen. Zusätzlich werden FGF-vermittelt Signale beispielsweise auch über den Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg weitergeleitet. Erwähnenswert ist ebenso die Aktivierung von FGF-Zielgenen durch den STAT-1 (SIGNAL TRANSDUCERS AND ACTIVATORS OF TRANSCRIPTION) Signalweg, da hier keine komplexe Signalkaskade durchlaufen werden muss, sondern der aktivierte STAT-Faktor direkt auf die Transkription wirken kann. Besonders interessant ist auch die Beobachtung, dass bestimmte Mitglieder der FGF-Familie nach Bindung an den Rezeptor alleine oder mit diesem internalisiert und zum Teil bis in den Kern transportiert werden. Hierfür gibt es allerdings nur indirekte Beweise und die biologische Relevanz dieser Beobachtung ist bisher noch nicht geklärt.

Paradebeispiel der FGF-Wirkung: Organogenese. In der allgemeinen Einleitung wurden bereits Beispiele von Funktionen gegeben, die FGF auf einzelne Zellen oder Gewebe haben kann. FGF ist zum größten Teil an Entwicklungsvorgängen beteiligt; eine unangemessene Aktivierung bestimmter FGFs kann aber auch zur Krebsentstehung beitragen. **Tabelle 2** fasst eine Reihe von Untersuchungen an FGF-spezifischen „*knock-out*“-Mäusen sowie Studien an anderen Vertebraten zusammen, die Aufschluss über die Normalfunktion des entsprechenden FGFs geben.

FGF	Null-Mutante	Phänotyp
1	lebensfähig	nicht identifiziert
2	lebensfähig	kardiovaskuläre, skelettäre und neuronale Defekte
3	lebensfähig	Defekt des Innenohrs und des Skeletts
4	letal, E4-5	Proliferation der inneren Zellmasse
5	lebensfähig	„Angora“-Mutation mit langen Haaren
6	lebensfähig	Muskeldegeneration
7	lebensfähig	Wachstum der Haarfollikel und der Nieren
8	letal, E7	Gastrulationsdefekte, Entwicklung der Extremitäten und des Zentralnervensystems
9	letal, P0	Defekte des Lungenmesenchym und der Geschlechtsbildung
10	letal, P0	Bildung der Extremitäten, der Lunge, des Thymus und der Hypophyse
12	lebensfähig	neuromuskuläre Auffälligkeit
14	lebensfähig	neurologische Auffälligkeit
15	letal, E9,5	unklar
17	lebensfähig	Hirnentwicklung
18	letal, P0	Skelettentwicklung

Tabelle 2: Phänotypen FGF-spezifischer „*knock-out*“-Mäuse (modifiziert nach Ornitz, 2001). Die Tabelle zeigt das jeweils inaktivierte FGF, den Zeitpunkt eventueller Letalität (E: Tag der Embryonalentwicklung; P: Tag nach Geburt) sowie den beobachteten Phänotypen. Die Diversität an Phänotypen verdeutlicht, dass die Mitglieder der FGF-Familie in Mäusen und wahrscheinlich allen Mammalia nur teilweise redundant agieren und die Vielzahl an FGFs evolutionär notwendig wurde, um auf die zunehmende Komplexität der Organismen zu reagieren.

Stellvertretend für die verschiedenen Entwicklungsphänomene sollen an dieser Stelle die molekularen Grundlagen der murinen Lungenentwicklung nur exemplarisch detaillierter erläutert

werden. FGF10 hat hier eine bedeutende Rolle in der Morphogenese des bronchialen Verzweigungsmusters (zur Übersicht: Hogan, 1999; Metzger und Krasnow, 1999; Warburton et al., 2000) – ein Vorgang, welcher der trachealen Morphogenese in *Drosophila* sehr ähnlich ist, die Gegenstand dieser Arbeit ist.

FGFs sind oftmals involviert in der Kommunikation zwischen verschiedenen Geweben wie Epithel und Mesenchym. So kommen in der murinen Lungenentwicklung im Mesenchym der Wachstumsfaktor FGF10 (Bellusci et al., 1997) und als entsprechender Rezeptor FGFR2 (Peters et al., 1992) im gesamten Entoderm und dem daraus entstehenden Lungenepithel zum Einsatz. Zunächst spaltet sich ab Tag 9 der Mausentwicklung ein Teil des Entoderms vom Darm ab und formt die Trachea sowie daran anhängend die linke und rechte Bronchie. Während der FGF-Rezeptor im gesamten Epithel des respiratorischen Trakts exprimiert wird, führt ein definiertes und diskretes Muster an FGF10 im Mesenchym wiederholt zur kontrollierten Verzweigung des Lungenepithels. Dies geschieht etwa am Tag 11-12 der Entwicklung. Derzeit gibt es zwei leicht unterschiedliche Modelle, wie FGF10 es ermöglicht, dass nicht eine einzige sackartige Ausstülpung, sondern ein feinverzweigtes bronchiales Epithel entsteht. Beispielsweise wäre ein genetisches Programm denkbar, dass FGF10 zeitlich variabel an immer wieder neuen Stellen exprimieren lässt und dadurch feine Abknospungen ermöglicht. Dies wäre der frühen Morphogenese des in *Drosophila* unter FGF-Kontrolle stehenden Tracheensystems (siehe auch: 1.2) sehr ähnlich. Mittlerweile ist aber anstelle eines fest definierten Expressionsmusters ein Modell der lateralen Inhibition akzeptiert (siehe **Abbildung 2**). In diesem wird FGF10 zunächst im gesamten Mesenchym exprimiert, die neu entstehende bronchiale Knospe wächst darauf zu. FGF10 aktiviert in der Knospe die Ausschüttung des Wachstumsfaktors SONIC HEDGEHOG (kurz: SHH), der genau im Zentrum der FGF10-Expression die weitere Expression dieses Faktors genetisch inhibiert (Bellusci et al., 1997). Damit ist das Auswachsen dieser Bronchie verhindert, ihre Flanken wachsen auf die verbleibenden lateralen FGF10-Quellen zu und eine Aufspaltung der Bronchie erfolgt. Zusätzlich werden durch SHH im Mesenchym neue genetische Programme aktiviert, die zur Ausbildung und Differenzierung von supportivem Gewebe und Lungengefäßen führen. Bestätigung findet dieses Modell vor allem aus der Analyse der „*knock-out*“-Mäuse für FGF10 (Min et al., 1998; Sekine et al., 1999), FGFR2 (Peters et al., 1994) und SHH (Litingtung et al., 1998). So zeigen die FGF10-Mutanten zwar Lungenanlagen, aber schon die Verzweigung der Trachea erfolgt nicht. Andererseits zeigt die Shh-Mutante nur zwei kleine sackartige Ausstülpungen, die direkt aus dem Vorderdarm auswachsen. Interessanterweise spielt laterale Inhibition auch bei der Entstehung des Tracheensystems von *Drosophila* eine Rolle (siehe auch: 1.2). Unter anderem wurde dort der FGF-Antagonist Sprouty entdeckt (Hacohen et al., 1998), den es auch in der Lungenentwicklung bei den Mammalia gibt. Hier unterbricht er die Signalübertragung von FGFR2 auf die ERK-Kaskade (Tefft et al., 2002).

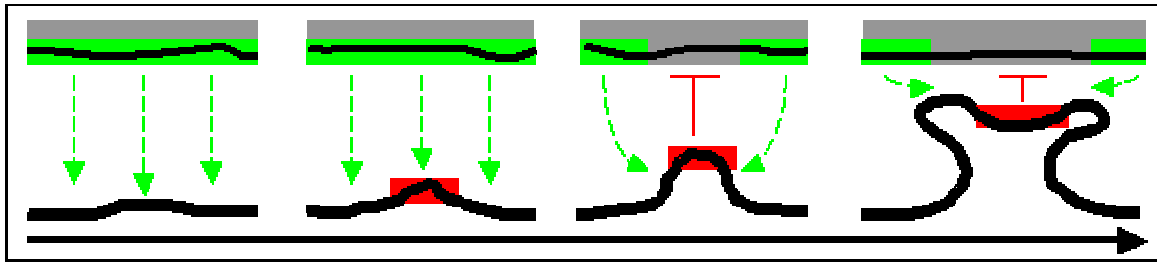


Abbildung 2: Die Morphogenese der bronchialen Verzweigungen basiert auf einem Mechanismus der lateralen Inhibition (modifiziert nach Metzger und Krasnow, 1999). Im zeitlichen Verlauf beeinflussen sich die Wachstumsfaktoren FGF10 (Expression und Wirkung: grün) und SHH (Expression und Wirkung: rot). Dabei kommt es zur Aufspaltung eines bronchialen Astes erster Ordnung in zwei bronchiale Äste zweiter Ordnung. Zunächst produziert das dem Lungenepithel gegenüberliegende Mesenchym FGF10. Dieses reagiert mit dem FGFR2 im Lungenepithel. Daraufhin kommt es zur Migration der Epithelzellen, die ihrerseits mit der Expression von SHH antworten. SHH inhibiert an den Stellen seiner größten Konzentration die Expression des mesenchymalen FGF, die lateral verbleibenden FGF-Quellen sorgen für die Aufspaltung des FGF-responsiven Epithels. Dieser Vorgang wiederholt sich in der murinen Lungenentwicklung 6-8 mal, beim Menschen sogar bis zu 20 mal, was in geschätzten 17×10^6 bronchialen Ästen resultiert.

FGF10 ist nur einer von vielen Faktoren, der die bronchiale Morphogenese steuert. Unter anderem tragen auch FGF2 und FGF7 zu diesen Prozessen bei, ebenso wie Wachstumsfaktoren aus anderen Proteinfamilien. Die Mechanismen der Lungenentwicklung sind also noch nicht vollständig geklärt (Warburton et al., 2000).

Die FGF-Proteinfamilie und ihre Rezeptoren: Über den evolutionären Ursprung von FGF ist wenig bekannt. Man findet kein FGF in einzelligen Organismen, einzig eine FGF-artige Sequenz wurde im Genom eines Baculovirus gefunden. Klar ist aber, dass bereits Invertebraten verschiedener Stämme wie den Nematoden (stellvertretend: *C. elegans*) und den Insekten (stellvertretend: *Drosophila*) über vollausgebildete und den höheren Vertebraten vergleichbare FGF-Signalkaskaden verfügen, die für die Normalentwicklung essentiell sind. Aus **Tabelle 3** wird deutlich, dass mit dem Erreichen einer neuen evolutionären Stufe nicht mehr nur ein oder zwei Proteine pro Signalkomponente ausreichen, um der Komplexität der Entwicklungsvorgänge Rechnung zu tragen, sondern zuweilen ganze Proteinfamilien entstanden sind. So nimmt man aufgrund von phylogenetischen Berechnungen an, dass die Expansion der FGF-Familie während einer Phase genomweiter Genduplikationen stattgefunden hat, die kennzeichnend für die Entstehung der Vertebraten war (Ornitz und Itoh, 2001).

Wie ist die FGF-Proteinfamilie charakterisiert? Die meisten der zwischen 17-34 kDa großen FGFs verfügen über 28 stark konservierte und sechs identische Aminosäuren, welche die Interaktion mit dem Rezeptor herstellen (Plotnikov et al., 2000). Die Röntgenstrukturanalysen von humanem FGF1 und FGF2 (Eriksson et al., 1991; Zhu et al., 1991) identifizierten eine Kleeblattstruktur, die sich aus drei viersträngigen β -Faltblätter zusammensetzt. Zwei von insgesamt zwölf antiparallelen β -Strängen akkumulieren mehrere basische Aminosäuren, von denen man vermutet, dass sie Heparansulfat-

Proteoglykane binden können, die als extrazellulär an die Zielzelle gebundene Kofaktoren an der Rezeptorbindung und somit Aktivierung teilhaben.

Molekulare Funktion	Struktur	Homologe in <i>C. elegans</i>	Homologe in <i>Drosophila</i>	Homologe in Mammalia
Ligand	FGF	EGL-17 LET-756	BRANCHLESS PYRAMUS THISBE	FGF1-22
Rezeptor	FGFR	EGL-15	BREATHLESS HEARTLESS	FGFR1-4
Synthese von Heparansulfat-Proteoglykanen (als Korezeptor)	divers	vorhanden	SULFATELESS SUGARLESS dHS6ST	N-Deacetylase/ N-Sulfotransf. UDP-Glukose Dehydrogenase Heparansulfat-6-O-Sulfotransf.
RAS-aktivierender Komplex	SH2/SH3-Adapter	vorhanden	DRK	Grb2
	SHP-Tyrosinphosphatase	vorhanden	CSW	SHP2
	Nukleotidaustauschfaktor	vorhanden	SOS	SOS1-3, RAS-GRF1-3, CDC25
	Multisubstratadaper	vorhanden	-	Frs2
	stützendes (<i>scaffolding</i>) Protein	-	DOF	-
ERK-Kaskade	RAS	vorhanden	RAS1	Ha-RAS, N-RAS, K-RAS
	RAF	vorhanden	RAF1	RAF1, A-RAF, B-RAF
	MEK	vorhanden	ROLLED	MEK
	ERK	vorhanden	DSOR	ERK1-3
negativer Regulator	RAS-GAP	vorhanden	vorhanden	vorhanden
	Cysteinreich	-	SPROUTY	SPROUTY1-3

Tabelle 3: Konservierung von Komponenten der FGF-Signalkaskade im Tierreich (modifiziert nach Borland et al., 2001). Für die beiden Invertebraten *C. elegans* und *Drosophila* sowie für Mammalia sind die wichtigsten Signalkomponenten aufgeführt. Bestimmte Faktoren sind nicht in allen Stämmen vorhanden, oder besser: beschrieben. Dennoch zeichnet sich ab, dass die FGF-Signalkaskade evolutionär konserviert ist und dass der zunehmenden Komplexität der Tiere dadurch Rechnung getragen wurde, dass bestimmte Funktionen zunehmend von mehreren Faktoren erfüllt wurden. Als Beispiel sei hier der FGF-Rezeptor genannt, von dem es in *C. elegans* einen, in *Drosophila* zwei und in den Mammalia vier gibt.

Zur Zeit sind 22 Mitglieder der humanen FGF-Proteinfamilie bekannt. Man kann sie basierend auf ihrer Sequenzähnlichkeit zueinander, ihrer biochemischen Eigenschaften und auch ihrer Entwicklungsspezifität in verschiedene Subfamilien unterteilen. Dies gilt auch für die FGFs anderer Vertebraten. Innerhalb einer Spezies haben die FGFs eine Sequenzidentität zwischen 15 und 70%, die Ähnlichkeit liegt zumeist deutlich über 50%. Die FGFs sind hochkonserviert, auch Orthologe aus verschiedenen Vertebraten zeigen oft über 90% Sequenzidentität. Während für Mensch und Maus beinahe dieselben FGFs gefunden wurden (mit der Ausnahme, dass humanes FGF15 und murines FGF19 bisher nicht gefunden wurden, aber murines FGF15 und humanes FGF19 zu den jeweiligen FGF3 und FGF4 homolog sind), kennt man im Huhn *Gallus* und dem afrikanischen Krallenfrosch

Xenopus sieben und im Zebrafrisch *Danio* vier Homologe. Erwartungsgemäß sind die FGFs der Invertebraten weniger konserviert, doch zeigt sich, dass selbst das 84 kDa große Homologe BRANCHLESS (BNL) aus *Drosophila* in seiner Kerndomäne auf Sequenzebene eher mit humanem FGF2 oder FGF10 korreliert als mit den entsprechenden Homologen aus *C. elegans*, die Ähnlichkeit mit dem humanen FGF8 zeigen (eigene Beobachtungen). Die FGFs der Invertebraten bilden also keine eigene Gruppe, die zueinander ähnlich und von den FGFs der Vertebraten weit entfernt ist. Ähnliches in Bezug auf Sequenzhomologie und Konservierung gilt auch für die FGF-Rezeptoren.

Eine bisher ungelöste Fragestellung ist der Mechanismus der Sekretion von FGF. Die meisten FGFs verfügen über ein aminoterminalen Signalpeptid, dass die Ausschleusung des Wachstumsfaktors über die bekannten zellulären Mechanismen bewerkstelligt. Humanes FGF1 und FGF2 werden auf der Zelloberfläche und in der extrazellulären Matrix gefunden, für sie ist aber kein entsprechender Transportmechanismus bekannt.

1.1.1 Die Homologen des Fibroblastenwachstumsfaktors in der Fruchtfliege

Die Vorteile der Fruchtfliege *Drosophila* als Modellorganismus für die genetische Forschung und die Entwicklungsbiologie im Allgemeinen sind hinlänglich bekannt (zur Übersicht: Ashburner, 1989; Greenspan, 1997). Die Prinzipien der embryonalen Musterbildung in der Fruchtfliege und anderen Insekten sind vielen Lehrbüchern zu entnehmen (Wolpert et al., 1999; Alberts et al., 2002). Oftmals bietet die Fliege gerade aufgrund ihrer relativen Einfachheit gegenüber den Vertebraten einen exklusiven Einblick in die Funktionsweise der Gene und Proteine. Genetische Experimente lassen sich aufgrund der kurzen Generationszeit und der verfügbaren genetischen Werkzeuge vergleichsweise schnell umsetzen. Zumeist hat man in *Drosophila* auch weniger mit Redundanz und pleiotropen Effekten bei phänotypischen Untersuchungen zu kämpfen als in höheren Tieren, denkt man nur an die derzeit 22 bekannten FGFs und vier bekannten FGF-Rezeptoren der Mammalia. Es ist daher nicht verwunderlich, dass man versuchte, die entsprechenden Homologen der Fruchtfliege zu finden und zu analysieren.

Erst 1991 gelang es mit klassischen molekularbiologischen Methoden, die cDNA eines FGF-Rezeptors aus einer Phagenbibliothek zu isolieren (Glazer und Shilo, 1991). Weiterführende Untersuchungen waren namensgebend für BREATHLESS (BTL, englisch für: atemlos) und zeigten, dass dieser Rezeptor für das gerichtete Auswachsen des embryonalen Tracheensystems (Glazer und Shilo, 1991; Reichman-Fried et al., 1994; Reichman-Fried und Shilo, 1995; Lee et al., 1996) sowie die Migration spezifischer Gliazellen notwendig ist (Klamt et al., 1992). Bald wurde auch ein zweiter FGF-Rezeptor gefunden (Shishido et al., 1993). Diesen taufte man später HEARTLESS (HTL, englisch für: herzlos) aufgrund seiner Rolle in der Zellmigration während der Gastrulation und seiner Wirkung bei der Induktion verschiedener mesodermal abgeleiteter Organe wie Herz, viszeralem Mesoderm und

somatischer Muskelvorläufer (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Shishido et al., 1997). Die Liganden für die beiden Rezeptoren waren allerdings zunächst unbekannt.

Bei der systematischen Absättigung des Fliegen-genoms durch transposable Elemente (Spradling et al., 1995) wurden eine Vielzahl letaler Linien generiert. Auf der Suche nach Genen, die das definierte Auswachsen des embryonalen Tracheensystems alterieren, entdeckte man so eine Mutante, in der das FGF-Homologe BNL deaktiviert ist (Sutherland et al., 1996). Es zeigte sich, dass BNL der Ligand für BTL ist und durch ihn eine Rolle in der trachealen Zellmigration und Spezifikation bestimmter trachealer Subtypen ausübt (Sutherland et al., 1996). Die Analyse der Mutanten zeigte keinen mesodermalen Phänotyp und es konnte daher geschlossen werden, dass HTL nicht auf BNL reagiert.

Weitere FGF-Homologe wurden zunächst auch nach der kompletten Sequenzierung des Fliegen-genoms (Adams et al., 2000) nicht gefunden; wie man heute weiß, aufgrund von Fehlern in der Annotierung putativ genkodierender Abschnitte. Erst 2004 entdeckten zwei Arbeitsgruppen unabhängig durch unterschiedlicher Ansätze zwei weitere FGF-Homologe, die spezifisch für HTL sind und Mediatoren der mesodermalen Zellmigration und Spezifikation darstellen (Gryzik und Muller, 2004; Stathopoulos et al., 2004). Während eine Gruppe genomweit Fliegenlinien mit chromosomalen Defizienzen nach einem mesodermalen Phänotyp durchsuchte und dabei mit einem klassischen genetischen Ansatz die beiden auf dem Chromosom II benachbart liegenden Gene fand (Gryzik und Muller, 2004), konzentrierte sich die andere Gruppe auf die Ergebnisse einer zuvor durchgeführten Transkriptomanalyse, die Zielgene des Transkriptionsfaktors DORSAL (DL) identifizierte (Stathopoulos et al., 2002). Dieser Transkriptionsfaktor ist im frühen Embryo in Form eines nach ventral zunehmenden Gradienten exprimiert und steuert unter anderem über die beiden Zielgene *twist* (*twi*) und *snail* (*sna*) die Bildung des Mesoderms (Jiang et al., 1991; Leptin, 1991). Es zeigte sich nun, dass die beiden FGF-Homologen abhängig von DL sind (Stathopoulos et al., 2004) und die Defizienz über beide Gene denselben Phänotyp zeigt wie die Inaktivierung von HTL, nämlich den Verlust der mesodermalen Zellmigration sowie die fehlende Bildungen mesodermaler Gewebe (Gryzik und Muller, 2004; Stathopoulos et al., 2004). Um noch einmal zur griechischen Mythologie zurückzukehren, seien die Namen dieser beiden neuen FGF-Homologen genannt: PYRAMUS (PYR) und THISBE (THS), da sie wie die Liebenden in Ovids Metamorphose eng verbunden sind und ihr Phänotyp den Verlust des Herzens zeigt.

In der Fruchtfliege sind somit drei verschiedene Homologe von FGF im Genom kodiert. Zu welchen FGFs sind sie nun homolog? BNL wird als Homologes von FGF1, FGF2 (Sutherland et al., 1996) und FGF10 (Min et al., 1998) diskutiert, wofür es Argumente auf Sequenzebene (siehe **Abbildung 3**) und Funktion gibt, so man die Parallelen zwischen Tracheen- und Lungenentwicklung gelten lässt. Die Faktoren PYR und THS zeigen ihre größte Sequenzähnlichkeit zu FGF8 und FGF18 der Mammalia (Gryzik und Muller, 2004; Stathopoulos et al., 2004). Hier wird auch angeführt, dass FGF8 während der Entwicklung von Huhn und Maus für die Zellmigration der Epiblasten aus dem

Primitivstreifen verantwortlich ist und somit für die Bildung mesodermaler und endodermaler Gewebe wichtig ist. Dies wäre gleichbedeutend mit der Bildung des Mesoderms in *Drosophila* in Abhängigkeit von PYR und THS.

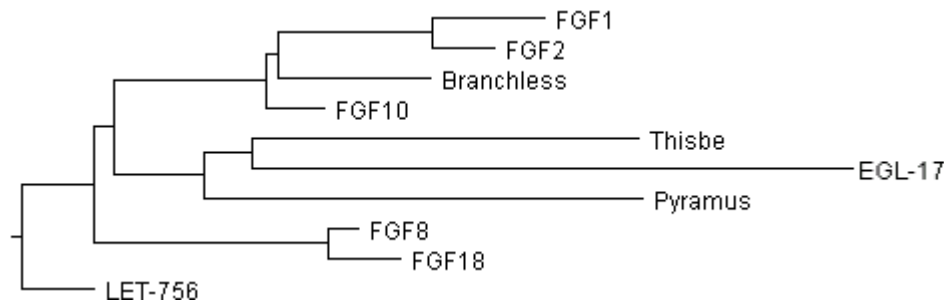


Abbildung 3: Phylogenetischer Baum ausgewählter FGFs der Mammalia sowie der Homologen aus *C. elegans* und *Drosophila*. Für die einzelnen Proteine wurden exemplarisch Primärsequenzen aus GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) bezogen und mit dem Programm MegAlign v5.07 unter Anwendung des ClustalW-Algorithmus (PAM250 Substitutionsmatrix, Gap Penalty 18, Gap Length Penalty 1) miteinander verglichen. Es zeigt sich, dass BNL näher mit FGF1, FGF2 und FGF10 verwandt ist, während PYR und THS untereinander nahe stehen, aber nicht wie publiziert so nahe mit FGF8 verwandt sind. Interessanterweise sind sie eher mit EGL-17 aus *C. elegans* verwandt, der dort für die Zellmigration während der Vulvainduktion wichtig ist (Burdine et al., 1998).

1.1.2 Multiple Rollen von *Drosophila* Branchless

Die wohl augenscheinlichste Funktion übt BNL in der Bildung des embryonalen und adulten Tracheensystems aus (siehe Kapitel: 1.2).

Auch in der Geschlechtsdetermination wurde ein Einfluss von Branchless ausgemacht. Seine Expression wird in genitalen Imaginalscheiben von der weiblichen Spleißvariante von DOUBLESEX^F (DSX) zellautonom reprimiert, ist aber in männlichen Tieren in distinktem Muster vorhanden (Ahmad und Baker, 2002). Dort rekrutiert BNL mesodermale Zellen, die sich der Imaginalscheibe anlagern, später sogar ihre mesodermale Identität verlieren und epitheliale Markergene exprimieren. Aus diesem Zellmaterial entstehen dann während der Verpuppung die Hoden sowie der *Vas deferens*. Durch die gezielte Missexpression von DSX und BNL lassen sich so unabhängig von der Geschlechtsidentität des Tieres entsprechende Organe induzieren (Ahmad und Baker, 2002). Bemerkenswert ist, dass man auch in eigentlich männlichen Mäusen durch den spezifischen „knock-out“ von FGF9 weibliche Geschlechtsorgane induzieren kann (Colvin et al., 2001), und dass FGF9 wiederum relativ ähnlich zu FGF1 und FGF2 und somit zu BNL ist.

Berücksichtigt man die Spezifität von BNL für den Rezeptor BTL sowie von PYR und THS für den Rezeptor HTL, so könnte BNL auch eine Rolle für die Entwicklung des Zentralnervensystems der sich entwickelnden Fruchtfliege spielen. Ab etwa dem embryonalen Stadium 5, während der Gastrulation, wird BTL in zwei zellbreiten Streifen flankierend zum einwandernden Mesoderm exprimiert, wo sie nach Abschluss der Migrationsbewegung als Mittellinie zum Liegen kommen. Dort wird die Expression fortgesetzt und bis Ende Stadium 12 ist sie besonders stark in posterioren Segmenthälften, vor allem in den Gliazellen der Mittellinie (Klamt et al., 1992). Nicht überraschend beobachtet man

einen spezifischen neuronalen Phänotyp in Tieren, bei denen BTL inaktiviert ist: Gliazellen migrieren nicht wie in der Normalentwicklung zu den posterior gelegenen Kommissuren, sondern verbleiben weitgehend in anteriorer Position. Da diese Gliazellen aber für die Stabilisierung der Kommissuren notwendig sind, wird die Gesamtentwicklung des Zentralnervensystems gestört (Klamt et al., 1992). Es wäre nun zu erwarten, dass diese Prozesse durch BNL als spezifischer Ligand von BTL vermittelt werden. Interessanterweise findet sich aber keine Expression von BNL in der Nähe der Mittellinie, und auch die Missexpression von BNL zeigt keinen neuronalen Phänotyp (eigene Beobachtungen).

Es gibt verschiedene Hinweise auf eine Beteiligung von BNL an einer Reihe von physiologischen Reaktionen. So dient es als Signalstoff, um in der Larve unter hypoxischen Bedingungen zusätzliche Tracheen in sauerstoffarme Gewebe zu leiten (siehe: 1.2). Auch wurde BNL als Signalstoff für den Wundverschluss und das Versorgen der Wundstelle mit Tracheen nach Verletzungen beschrieben (Galkow und Krasnow, 2001).

1.2 *Branchless ist essentiell für die Entwicklung des Tracheensystems von *Drosophila melanogaster**

Das Tracheensystem von *Drosophila* ist ein tubuläres epitheliales Netzwerk, das der Larve und in stark modifizierter Form auch der adulten Fliege zur Versorgung mit Sauerstoff und zum Abtransport von Kohlendioxid dient. Die Tracheen werden bereits embryonal als weitverzweigtes Röhrensystem angelegt, werden aber erst gegen Ende der Embryogenese, kurz vor dem Schlüpfen der Larve, funktionell bedeutsam. In der weitverzweigten Struktur und der Transportfunktion ist das Tracheensystem sowohl dem Blutkreislaufsystem als auch den Lungen der Vertebraten ähnlich; und auch die molekularen Mechanismen, die den jeweiligen Entwicklungsprozessen zu Grunde liegen, zeigen eine starke Homologie zueinander (zur Übersicht: Metzger und Krasnow, 1999; Affolter und Shilo, 2000; Zelzer und Shilo, 2000a; Ghabrial et al., 2003).

1.2.1 *Die Morphogenese und Morphologie des Tracheensystems*

Die Morphologie und Morphogenese des Tracheensystems von *Drosophila* ist umfangreich (Manning und Krasnow, 1993). Zum Verständnis der vorliegenden Arbeit ist nur ein kurzer Überblick über diese Prozesse notwendig: Im Stadium 11 spaltet sich pro Hemisegment auf jeder Seite des Embryos eine Gruppe von etwa 40 ektodermalen Zellen ab und wandert in das unterliegende Mesoderm. Die Zellen einer solchen Plakode teilen sich noch genau einmal, und schon während der weiteren Invagination bilden sich im Stadium 12 genau sechs fingerartige Ausläufer aus diesen 80 Zellen aus. In den nächsten beiden Embryonalstadien elongieren diese Ausläufer und bilden durch reine Migrationsvorgänge die stereotype Struktur des Tracheensystems mit einem dorsalen Hauptstamm sowie Verzweigungen zum Nervensystem, zum viszeralem Mesoderm oder nach dorsal. Bis zum Stadium 16 führt die definierte Elongation und Fusion bestimmter Tracheenäste zu einem komplexen Netzwerk, bestehend aus dem von posterior nach anterior verlaufenden dorsalen

Hauptstamm und einem weiter ventral gelegenen lateralen Stamm. Diese stehen über die transverse Verbindung in Kontakt und bilden die Basis für spezialisierte Äste, die beispielsweise der Versorgung von Viszerum und Nervensystem dienen, und aus denen sekundäre Äste und Terminaläste zur zellgenauen Versorgung auswachsen. Der Ablauf dieser Prozesse ist in **Abbildung 4** zusammengefasst. Ist das Grundmuster des Tracheensystems definiert, kommt es zunächst noch zur Lumenvergrößerung der primären Äste sowie etwa drei Stunden vor Ende der Embryogenese und dem Schlüpfen der Larve zur trachealen Gasfüllung.

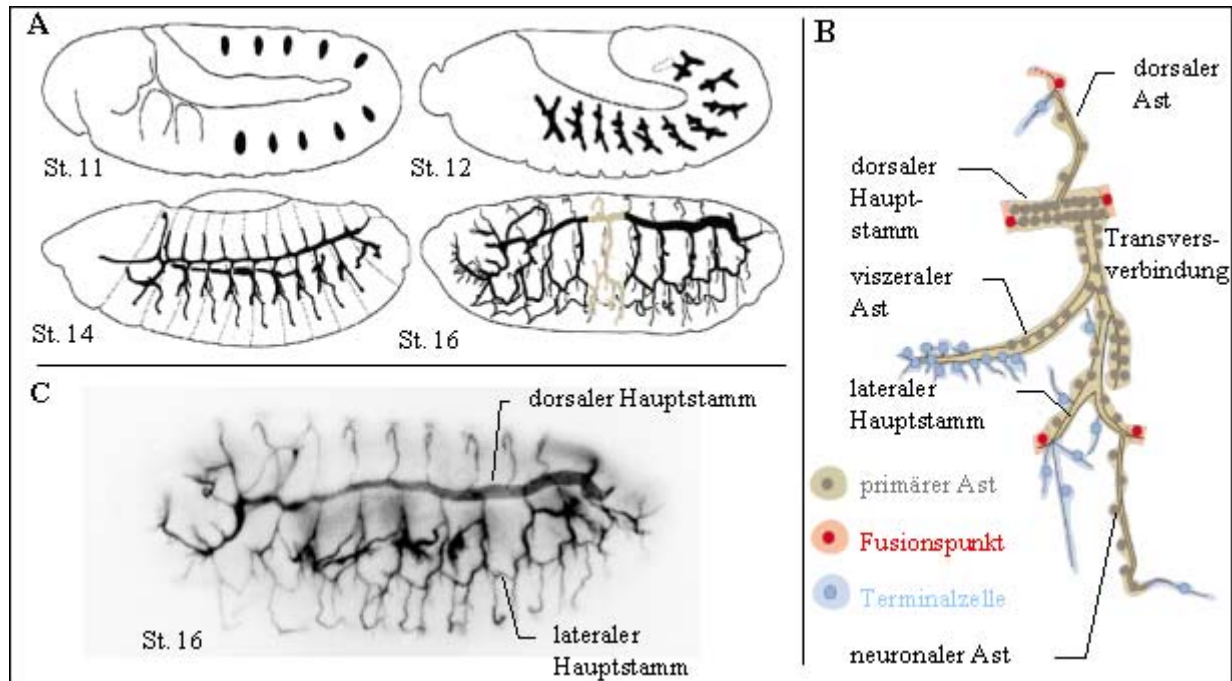


Abbildung 4: Übersicht über Morphogenese und Morphologie des embryonalen Tracheensystem der Fruchtfliege *Drosophila* (modifiziert nach Manning und Krasnow, 1993; Uv et al., 2003). (A) **Morphogenese.** Die Bildung des embryonalen Tracheensystems beginnt mit der Invagination ektodermaler Zellen im Stadium 11. Die Zellen der segmental angelegten Tracheenplakoden bilden ab Stadium 12 stereotypisch sechs fingerartige Ausläufer, die während der weiteren Entwicklung elongieren und bereits im Stadium 14 am dorsalen Hauptstamm miteinander fusionieren. Weitere tracheale Äste wachsen nach einem definierten Muster aus, um die Versorgung von Zielgeweben wie Viszerum und Nervensystem zu gewährleisten. Bis zum Ende des Stadiums 16 ist ein komplexes Netzwerk aus Tracheen entstanden. Nun wachsen von spezifischen Zellen terminale Äste bis hin zu einzelnen Zielzellen. Zur genaueren Betrachtung in Schema B ist ein segmentales Tracheensystem farblich hervorgehoben. (B) **Nomenklatur.** Segmental werden nach einem fixen genetischen Programm dieselben Tracheenäste (grau) gebildet, die an spezifischen Punkten (rot) an den Segmentgrenzen miteinander zu einem großen Netzwerk fusionieren. In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Sauerstoff werden ab Ende der Embryogenese bis zum Ende der Larvenstadien terminale Verzweigungen aus bestehenden Zellen (beides blau) gebildet. (C) **Grundmuster.** Laterale Ansicht eines Embryos im Stadium 16 nach Immunfärbung mit dem Antikörper 2A12, der spezifisch für das tracheale Lumen ist. Der Embryo ist äquivalent zur Darstellung des ähnlich entwickelten Embryos im Schema A. Zur Orientierung sind nochmals der dorsale und laterale Hauptstamm hervorgehoben, die den Embryo von posterior nach anterior durchlaufen.

Anders als beim dorsalen Hauptstamm wird bei den terminalen Ästen das Lumen nicht durch den Zusammenschluss mehrerer Zellen gebildet, oder wie bei den anderen primären und sekundären Ästen durch autozellulären Ringschluss, sondern alleine durch die Vergrößerung ihrer zellulären Oberfläche

und Bildung von Hohlräumen in ihrem Inneren (Samakovlis et al., 1996a). Auch ist ihre Entwicklung bei weitem nicht stark genetisch vordefiniert wie bei den anderen Tracheenästen, sondern ist eher von physiologischen Bedingungen abhängig. Doch wie sind die genetischen Mechanismen der trachealen Musterbildung?

1.2.2 Genetische Mechanismen der Verzweigungsmorphogenese

Mittlerweile sind mehr als 30 genetische Determinanten der trachealen Morphogenese identifiziert. Für die unterschiedlichen Prozesse der Tracheenentwicklung werden fast alle der bekannteren Signalkaskaden aktiviert.

Zunächst beginnt die Determination bestimmter ektodermaler Vorläuferzellen zu Tracheenzellen. Die genetische Determinante ist der Transkriptionsfaktor TRACHEALESS (TRH), der während der kompletten Tracheenentwicklung hindurch aktiv bleibt (Isaac und Andrew, 1996; Wilk et al., 1996). Er interagiert als heterodimerer Faktor mit seinem Partner TANGO (TGO), der auch in einer Vielzahl anderer Gewebe aktiv ist (Ohshiro und Saigo, 1997; Sonnenfeld et al., 1997; Zelzer et al., 1997). Der Transkriptionsfaktor DRIFTER (DRF) wird zusammen mit TRH und TGO benötigt (Zelzer und Shilo, 2000b), um die Expression des FGF-Rezeptors BTL (Ohshiro und Saigo, 1997; Boube et al., 2000) und anderer Zielgene (de Celis et al., 1995; Llimargas und Casanova, 1997) wie RHOMBOID (RHO) (Llimargas und Casanova, 1999) in den Tracheenzellen zu aktivieren. RHO gilt als Aktivator für die Signalkaskade des epidermalen Wachstumsfaktors und ist wichtig für die initiale Invagination der Tracheenplakode. Ebenso wurde gezeigt, dass die Aktivierung von TRH von der Proteinkinase B DAKT abhängt (Jin et al., 2001; Lavenburg et al., 2003), die selbst wiederum durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg angeschaltet wird.

Doch was sind die genetischen Voraussetzungen für die Expression von TRH? Das Zusammenspiel der Morphogene DECAPENTAPLEGIC (DPP) und WINGLESS (WNT) (Certel et al., 1996; Isaac und Andrew, 1996; Wilk et al., 1996) sowie Segmentierungsgene wie *domeless* (*dom*) und *stat92E* (Brown et al., 2001; Chen et al., 2002a) spielen hier eine Rolle.

Die Spezifikation, welche der Zellen innerhalb einer Tracheenplakode für welchen Ast rekrutiert werden wird, erfolgt über bereits benannte Signale: DPP wird in ektodermalen Streifen dorsal und ventral der Plakode exprimiert und definiert so deren dorsoventrale Orientierung (Vincent et al., 1997), SPITZ (SPI) (Gabay et al., 1997; Wappner et al., 1997) und WNT markieren eine Zentralregion (Chihara und Hayashi, 2000; Llimargas, 2000; Llimargas und Lawrence, 2001) und HEDGEHOG (HH) zeigt anteriore/posteriore Unterschiede (Glazer und Shilo, 2001) auf. All diesen Signalkaskaden sind entsprechende Zielgene nachgeschaltet, von denen nur wenige bekannt sind. Für die Ausbildung des dorsalen Hauptstammes sei der Ablauf kurz geschildert: Zunächst bindet DPP an seine Rezeptoren THICKVEINS (TKV) und PUNT (PUT) in Tracheenzellen und nachfolgend wird der Transkriptionsfaktor MOTHERS AGAINST DPP (MAD) phosphoryliert (Affolter et al., 1994b; Ruberte et al., 1995; Vincent et

al., 1997; Dorfman et al., 2002). Dies sorgt für die Expression von KNIRPS (KNI) und KNIRPS-RELATED (KNRL) (Vincent et al., 1997; Chen et al., 1998), welche wiederum als Transkriptionsfaktoren zumeist unbekannte Zielgene aktivieren, die für die Identität des dorsalen Hauptstammes und des dorsalen Asts notwendig sind (Llimargas und Casanova, 1997; Vincent et al., 1997; Chen et al., 1998; Ribeiro et al., 2002). Weiterhin ist die transkriptionelle Repression ein wichtiger Mechanismus: Der Transkriptionsfaktor SPALT (SAL) wird zunächst im dorsalen Hauptstamm und dem dorsalen Ast exprimiert, in letzterem später aber durch KNI und KNRL durch direkte Bindung an ein regulatorisches Element im *sal* Gen herunterreguliert (Kuhnlein und Schuh, 1996). Man nimmt an, dass SPI und WNT ebenfalls die Expression von Sal beeinflussen. Dadurch lässt sich ein Modell etablieren, dass innerhalb der trachealen Plakode definierte Grenzen durch die Interaktion verschiedener Morphogengradienten herstellt (Wappner et al., 1997; Llimargas, 2000).

Parallel zu den Spezifikationsvorgängen beginnt das definierte und zielgerichtete Auswachsen der Tracheenäste, die eigentliche Verzweigungsmorphogenese, die vollständig auf der Migration und Elongation von Zellen beruht. Die beiden Schlüsselmoleküle sind BNL und BTL. Sie geben unter anderem die Richtungsinformation für das Auswachsen der fingerartigen Ausläufer aus den Tracheenplakoden im Stadium 12 vor, sind wichtig für die grundlegende Blaupause des embryonalen Tracheensystems sowie für das dynamische Auswachsen terminaler Tracheenzellen in Abhängigkeit der Sauerstoffbedingungen. Doch wie ist eine derartige Mehrfachnutzung ein und desselben Signalweges in so vielen verschiedenen Prozessen möglich?

Der FGF-Rezeptor BTL wird in allen Tracheenzellen vom Beginn der Tracheogenese bis zum letzten Embryonalstadium stark exprimiert (Glazer und Shilo, 1991; Klambt et al., 1992). Außerhalb des Tracheensystems, in den jeweiligen Zielregionen der trachealen Äste, wird in einem dynamischen Muster wiederkehrend der Ligand BNL von benachbarten Zellen des Mesoderms und der Epidermis exprimiert (Sutherland et al., 1996). Erreicht ein trachealer Ast sein Ziel, wird BNL an dieser Stelle herunterreguliert und wird in der nächsten Zielregion exprimiert. Die Aktivierungsmechanismen dieses genetisch fix definierten Expressionsprogramms sind nicht bekannt; einzig weiß man, dass die dorsale Expression von BNL offensichtlich von DPP abhängt (Vincent et al., 1997). Folgt man dem Signal von der Expression über die extrazelluläre und intrazelluläre Vermittlung bis zu den zellulären Konsequenzen, so zeigt sich, dass man für Genmutanten der gesamten FGF-Signalkaskade in *Drosophila* tracheale Phänotypen beobachten kann. Die Mutanten der Kernkomponenten BTL (Glazer und Shilo, 1991; Klambt et al., 1992; Reichman-Fried et al., 1994; Reichman-Fried und Shilo, 1995; Lee et al., 1996) und BNL (Sutherland et al., 1996) zeigen die deutlichsten Phänotypen, das Auswachsen der Tracheenäste bleibt aus und aus den Tracheenplakoden bilden sich nur Netzwerkrudimente aus.

Extrazellulär sind weiter sulfonierte Heparanproteoglykane notwendig, die möglicherweise als Korezeptoren BNL näher an BTL bringen. Die Mutanten für die Syntheseeenzyme DHS6ST (eine Heparansulfat-6-O-Sulfotransferase) (Kamimura et al., 2001) sowie SULFATELESS (SFL; eine N-

Deacetylase/N-Sulfotransferase) und SUGARLESS (SGL; eine UDP-Glukosedehydrogenase) (Lin et al., 1999) zeigen Migrationsdefekte, denen durch die Überexpression von BNL teilweise gegengesteuert werden kann. Mitglieder der evolutionär hochkonservierten ERK-Signalkaskade zeigen ebenfalls tracheale Phänotypen. Zwar existiert in *Drosophila* kein FRS2, doch wird diese Rolle hier von DOWNSTREAM-OF-FGFR (DOF; auch STUMPS oder HEARTBROKEN) übernommen, welches nach der Rezeptoraktivierung das Homologe von SHP2, CORKSCREW (CSW), rekrutiert (Dossenbach et al., 2001; Petit et al., 2004). Mutanten von DOF (Michelson et al., 1998; Vincent et al., 1998; Imam et al., 1999) und CSW (Perkins et al., 1996) zeigen einen Phänotyp, der dem Funktionsverlust von BNL sehr ähnlich ist. Die Zielgene der FGF-Signalkaskade in der primären Verzweigungsmorphogenese sind weitgehend unbekannt. Man kennt als wahrscheinliche Ziele die Transkriptionsfaktoren TRACHEA DEFECTIVE (TDF) (Eulenberg und Schuh, 1997) und RIBBON (RIB) (Bradley und Andrew, 2001; Shim et al., 2001), doch ist über ihre Zielgene bisher nichts bekannt. Interessanterweise ist das primäre Auswachsen der Tracheen bei Mutanten von RAS und RAF weniger stark gestört als andere Verzweigungsvorgänge (Reichman-Fried et al., 1994). Alternative zelluläre Mechanismen könnten hier eine wichtige Rolle spielen, beispielsweise durch die Existenz einer Zellkontakt vermittelnden mesodermalen Brückenzelle für den dorsalen Hauptstamm (Wolf und Schuh, 2000; Wolf et al., 2002). Schließlich werden Mechanismen und Faktoren benötigt, welche die Zellmigration an den Segmentgrenzen stoppen und die Fusion der trachealen Metamere miteinander vermitteln. Stellvertretend seien hier SHORT STOP (SHOT) (Tanaka-Matakatsu et al., 1996) und das Homologe zu E-Cadherin SHOTGUN (SHG) (Tanaka-Matakatsu et al., 1996) genannt, das durch den Transkriptionsfaktor ESCARGOT (ESG) aktiviert wird (Samakovlis et al., 1996b; Tanaka-Matakatsu et al., 1996).

Neben der Migration der primären Tracheenstämme induziert das BNL-Signal eine Reihe trachealer Spezialbildungen wie sekundärer und terminaler Äste. Dies geschieht über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren POINTED (PNT) (Samakovlis et al., 1996b; Hacohen et al., 1998) und DSRF (Affolter et al., 1994a; Guillemín et al., 1996; Montagne et al., 1996) (*serum response factor*, englisch für: serumabhängiger Faktor) sowie den Abbau des transkriptionellen Repressors YAN (Ohshiro et al., 2002). Die Zielgene der Transkriptionsfaktoren sind auch hier weitgehend unbekannt. Allerdings weiß man, dass die Selbstaktivierung von BTL über einen Rückkopplungsmechanismus von der ERK-Signalkaskade und PNT verläuft (Ohshiro und Saigo, 1997; Ohshiro et al., 2002). Doch warum ändern nicht alle Zellen aufgrund von BNL ihre tracheale Identität? Mehrere interzelluläre Mechanismen und laterale Inhibition sorgen dafür, dass nur ausgewählte Zellen zum sekundären oder terminalen Ast differenzieren können, während andere nur mit Migration oder Elongation reagieren. Zum einen sei hier SPROUTY (SPRY) genannt, ein membrangebundener Antagonist für die Signalwege von BTL und auch anderer Rezeptortyrosinkinasen (Hacohen et al., 1998; Casci et al., 1999; Kramer et al., 1999; Reich et al., 1999). Zunächst exprimieren einzelne zufällig ausgewählten Tracheenzellen sekundäre Markergene und nehmen wahrscheinlich sekundäre Identität an. Dort wird dann SPRY aktiv und sorgt

dafür, dass deren Nachbarzellen auf BNL nicht mit der Änderung ihrer Identität reagieren können (Hacohen et al., 1998). Über die molekularen Ursachen dieses Vorgangs herrscht derzeit noch Unklarheit. Bemerkenswerter Weise ist SPRY mittlerweile auch in Mammalia bekannt, wo er eine Rolle in der Lungenentwicklung (zur Übersicht: Metzger und Krasnow, 1999) spielt. Auch das Protein HEADCASE (HDC), das für die Verschmelzung der trachealen Metamere wichtig ist, verhindert in den entsprechenden Fusionszellen die Induktion sekundärer oder terminaler Identität (Steneberg et al., 1998). Andererseits induziert PNT die Expression von DSRF und somit terminaler Identität, unter anderem durch die Inhibition des Fusionsmarkers ESG in den betreffenden Zellen (Samakovlis et al., 1996b). NOTCH (N) und DELTA (N) werden ebenfalls im Tracheensystem exprimiert und sorgen ähnlich ihrer Funktionsweise im Nervensystem über laterale Inhibition dafür, dass an den entsprechenden Zellen nur genau eine Fusionszelle oder genau eine Terminalzelle gebildet werden (Ikeya und Hayashi, 1999; Llimargas und Casanova, 1999). Die Funktionsweise bei der Induktion dieser Zellidentitäten ist in **Abbildung 5** noch einmal zusammenfasst.

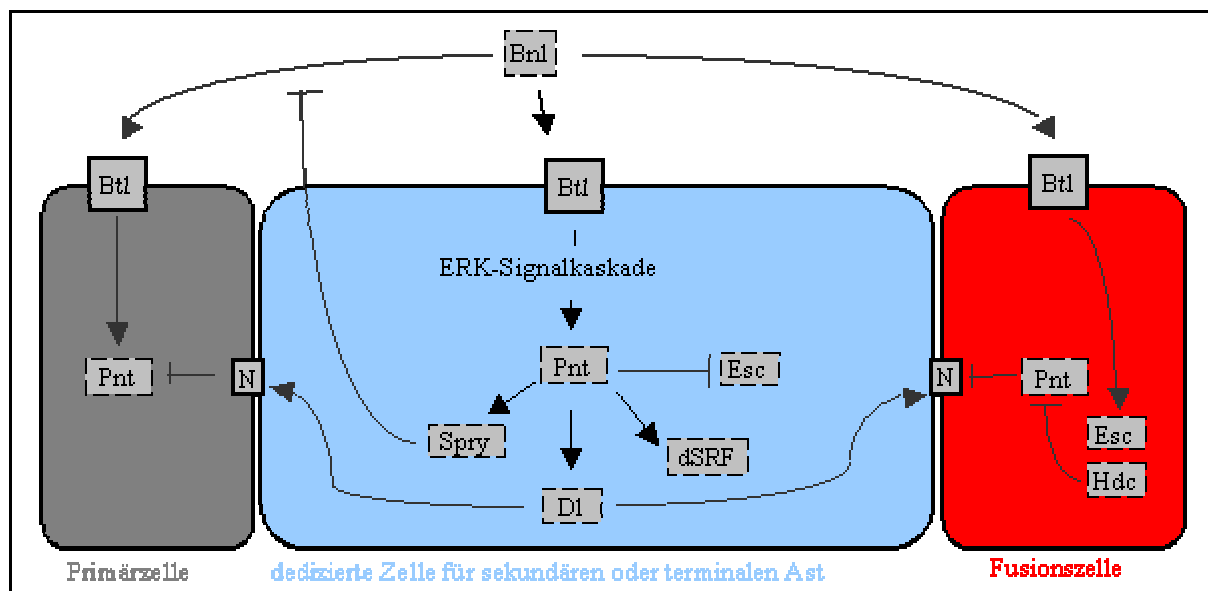


Abbildung 5: Mechanismus der Herausbildung sekundärer oder terminaler Tracheenäste. Nach dem primären Auswachsen kann BNL noch Tracheenäste sekundärer oder terminaler Identität induzieren. Ebenso ist die Fusion von Tracheenzellen mit den Tracheen benachbarter Metamere möglich. Die Farbkodierung entspricht dem Schema zur Morphologie in Abbildung 4 B. Über die ERK-Signalkaskade wird in der für sekundäre Identität dedizierten Zelle zunächst der Transkriptionsfaktor PNT eingeschaltet, oder für terminale Identität durch PNT der Transkriptionsfaktor DSRF. Gleichzeitig wird der Fusionsmarker ESC in dieser Zelle inhibiert, sowie DL und SPRY aktiviert. DL und SPRY verhindern über ihre jeweiligen Mechanismen die Terminalzellidentität in der benachbarten Primärzelle. Ebenso verhindern DL aus der sekundären oder terminalen Zelle in der benachbarten Fusionszelle die Expression von PNT, was in dieser endogen auch durch den Fusionsmarker HDC geschieht.

Neben der bisher dargestellten genetisch fix definierten Tracheogenese gibt es zusätzliche Mechanismen, die dem Tracheensystem eine gewisse Plastizität in Abhängigkeit der umgebenden Sauerstoffbedingungen ermöglicht. Zwar bleibt das tracheale Grundmuster in den Larvalstadien der Insekten erhalten, doch wird die Anzahl der terminalen Tracheenverzweigungen durch die

Sauerstoffkonzentration reguliert (Wigglesworth, 1954; Locke, 1958). Es wurde gezeigt, dass die Anzahl der Verzweigungen über die steigende Konzentrationen von BNL bei zunehmender hypoxischer Außenumgebung gesteuert wird (Jarecki et al., 1999). Dabei steht BNL möglicherweise unter der Kontrolle des transkriptionellen Aktivators SIMILAR (SIMA) (Ghabrial et al., 2003), dem Homologen des Hypoxie induzierbaren Faktors HIF-1 (Nagao et al., 1996), der unter normalen Sauerstoffbedingungen von Komponenten einer evolutionär konservierten Signalkaskade aus einer O₂-abhängigen Prolylhydroxylase (Bruick und McKnight, 2001) und einer E3-Ligase (Adryan, 2000; Adryan et al., 2000) der proteasomalen Degradation zugeführt wird (Lavista-Llanos et al., 2002). Auch Stickstoffmonoxid trägt zu diesen Prozessen bei (Wingrove und O'Farrell, 1999). Über die genetischen und morphologischen Mechanismen der terminalen Verzweigungen und Zielfindung durch zytoplasmatische Extensionen ist wenig bekannt.

Letztlich kennt man noch eine Reihe weiterer genetischer Faktoren, die für bestimmte zelluläre Verhaltensweisen kodieren. So orientieren sich die Tracheen im Bereich der Mittellinie am Verlauf des Nervensystems. Die definierten Substratwechsel von Nervenzellen zu Glia zurück zu Nervenzellen hängt hier besonders von den Transkriptionsfaktoren ADRIFT (AFT) (Englund et al., 1999) und UNPLUGGED (UNPG) (Chiang et al., 1995) sowie den neuronalen Genen SLIT (SLI) und ROUNDABOUT (ROBO) (Englund et al., 2002) ab. Weiterhin spielen Integrine als stabilisierende Elemente der extrallulären Matrix eine Rolle für das gerichtete Auswachsen der Tracheen (Boube et al., 2001). Andere Gene regulieren die Länge bestimmter trachealer Abschnitte durch die Stabilität der Zellkontakte innerhalb der Tracheenäste, hier sei beispielsweise das Claudin MEGATRACHEA (MEGA) genannt (Beitel und Krasnow, 2000; Behr et al., 2003). Abschließend sei erwähnt, dass das Tracheensystem während der Metamorphose noch einmal grundlegend verändert wird und nur geringfügig Strukturelemente im adulten Tier wiedergefunden werden können (Sato und Kornberg, 2002).

1.3 Funktionelle Genomik und Bioinformatik ermöglichen die genomweite Analyse des Transkriptoms

Die vollständige Sequenzierung vieler eukaryontischer Genome sowie die breite Verfügbarkeit von Hochdurchsatzmethoden eröffnet der molekularen Entwicklungsbiologie gänzlich neue Möglichkeiten zum Verständnis der Gene. Traditionell wurden im Organismus bestimmte Phänotypen betrachtet und durch entsprechende Experimente einzelne Gene sowie ihre aus dem Phänotypen hergeleitete Funktion identifiziert (englisch: *forward genetics*). Heute wird vielfach durch die genomweite Betrachtung der Genaktivität auf Ebene des Transkriptoms (und auch des Proteoms) versucht, das Netzwerk der genetischen Interaktionen zu verstehen und aus der Abhängigkeit der Gene und Proteine voneinander ihre Funktionen herzuleiten (siehe **Abbildung 6**). Die Betrachtung des organismischen Phänotyps einzelner Gene ist dann der letzte Schritt der biologischen Analyse (englisch: *reverse genetics*).

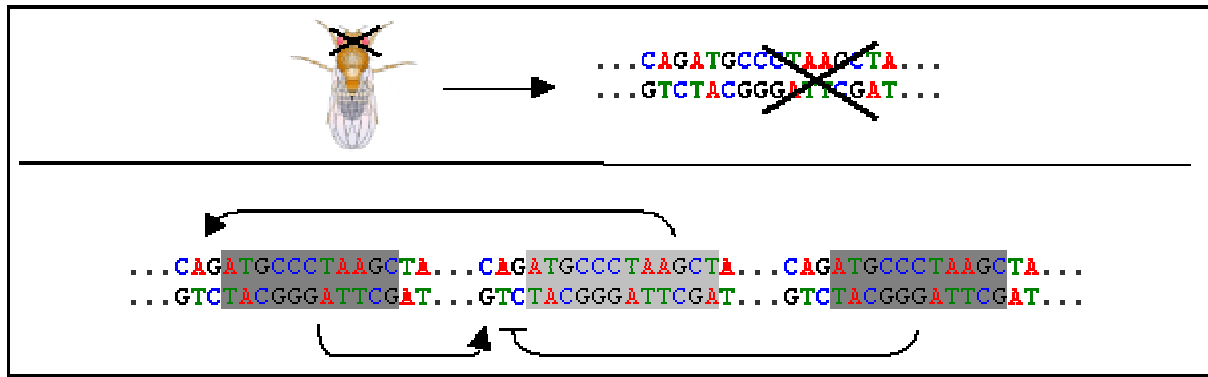


Abbildung 6: Forward (oben) und reverse (unten) genetics. Die klassische genetische Analyse führt einen Phänotypen auf den Ausfall eines Gens zurück. Die funktionelle Genomik hingegen versucht, Gene und Genfunktionen nicht isoliert zu betrachten, sondern unter Einbeziehung der Genomsequenzen die genetischen Interaktionen in ihrer Gesamtheit zu verstehen. Das Genom ist daher nicht mehr nur eine Abfolge von Basenpaarungen und die Betrachtung eines einzigen Gens ist nicht nur die Betrachtung eines Abschnitts darauf. Vielmehr wird versucht, das gesamte Genom im Kontext und in seiner logischen Struktur zu erklären, oftmals auch im phylogenetischen Vergleich zu anderen Organismen.

Eine grundlegende Voraussetzung, um das Potential genomweiter Analysen auszunutzen, ist die vorherige bioinformatische Identifikation der Gene innerhalb des Genoms. Dies ist notwendig, damit die experimentellen Ressourcen ausschließlich für die Analyse von Genabschnitten verwendet werden können anstatt für wahrscheinlich irrelevante intergenische Bereiche. Mittels computergestützter Methoden kann man heute relativ zuverlässig Genstrukturen wie Exons, Introns und offene Leserahmen aus Genomsequenzen vorhersagen (Burge und Karlin, 1997; Reese et al., 2000). Durch den Sequenzvergleich des neu identifizierten Gens und der putativen Aminosäuresequenz mit primären und sekundären Datenbanken (siehe **Tabelle 4**) können dann erste Rückschlüsse auf seine Funktion gezogen werden. Diesen Vorgang nennt man funktionelle Annotation. Eine überzeugende Annotation ist auch ein Merkmal, mit der man die Güte der Genvorhersage überprüfen kann: Die computergestützte Translation eines intergenischen Bereichs wird sehr wahrscheinlich zu nichts homolog sein, wohingegen ein tatsächlich existentes Gen wenigstens einige strukturell bekannte Eigenschaften aufweisen sollte.

Da alle primären und sekundären Datenbanken von verschiedener Struktur, vielfach redundant und zumeist nicht untereinander abgeglichen sind, ist eine automatische Annotation basierend auf ihren Daten zumeist recht problematisch. Die Verwendung verschiedener Nomenklaturen und Schreibweisen erschweren ebenfalls die biologische Interpretation der Daten, weshalb das kontrollierte Vokabular der *Gene Ontology* (GO)-Datenbank (Ashburner et al., 2000; GeneOntology Consortium, 2001) eingeführt wurde. GO ist nicht nur eine Datenbank, die den Datenbestand der anderen primären und sekundären Datenbanken übersetzt und verwaltet. GO ist und beschreibt auch eine systematische, dynamische Sprache, eine Ontologie zur Beschreibung molekularbiologischer Zusammenhänge und Begrifflichkeiten. So wird beispielsweise ein Transkriptionsfaktor mit putativer trachealer Funktion der molekularen Funktion „Transkription“ zugeordnet, gleichzeitig ist er unter der zellulären Komponente „Kern“ verzeichnet, ebenso wie dem biologischen Prozess „Tracheenentwicklung“. GO

bildet das bioinformatische Rückgrat vieler speziesspezifischer Datenbanken wie FlyBase und WormBase.

primäre Datenquellen (Quelle: einzelnes Experiment, Publikation)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ GenBank (Sequenzen aller Art), www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/ ▪ dbEST (für: <i>dbExpressed Sequence Tags</i>, mRNA-Fragmente), www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/ ▪ PDB (für: <i>Protein Data Base</i>, Strukturdaten), www.pdb.org/
sekundäre Datenquellen (Quelle: Kompilation und Annotation von Rohdaten)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ COG (für: <i>Collection of Orthologue Groups</i>, Sammlung orthologer Gruppen), www.ncbi.nlm.nih.gov/COG ▪ UniGene (Gruppen von ESTs für eine nichtredundante Nomenklatur), www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene ▪ KEGG (für: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>, metabolische Netzwerke aus der Literatur), www.kegg.org ▪ InterPro (funktionelle Domänen, Faltungen), www.ebi.ac.uk/interpro/

Tabelle 4: Beispiele für primäre und sekundäre Datenquellen der Bioinformatik. Primäre Datenquellen beziehen ihre Information aus einzelnen Experimenten (z.B. Ergebnis einer Sequenzierung) oder einer Publikation (z.B. Proteinstruktur). Sekundäre Datenbanken sammeln diese Information und stellen sie sinnvoll zusammen (z.B. verringert UniGene die Redundanz von GenBank und InterPro präsentiert Faltungen verschiedener Proteine). Angegeben ist der Name, der Inhalt der Datenbank in Klammern sowie die über das http-Protokoll erreichbare Adresse im Internet.

Beginnend mit dem Genomprojekt der Hefe wurden Strategien zur systematischen Expressionsanalyse entwickelt. Zunächst wurden immobilisierte cDNAs benutzt, um verschieden markierte RNA-Proben darauf zu hybridisieren und somit differentielle Genexpression zu analysieren (Skena et al., 1995). Diese Technik ist auch heute noch verfügbar, viele nicht-kommerziell hergestellte Plattformen (englisch: *Microarray* oder *Chip*) zur Transkriptomanalyse beruhen darauf. Mit dem Fortschreiten der funktionellen Genomik und Bioinformatik war es dann aber möglich, die Sequenzen bis dahin unbekannter Gene als Vorlage für die Synthese von komplementären Oligonukleotiden zu benutzen, und so unabhängig von der Verfügbarkeit von cDNAs Plattformen für die Transkriptomanalyse zu entwickeln (zur Übersicht: Xiang und Chen, 2000). So gibt es derzeit für maximal zwei Drittel der bekannten Gene aus *Drosophila* einen Vertreter in den cDNA-Bibliotheken (Stapleton et al., 2002), dennoch steht beispielsweise ein *Chip* mit allen vorhergesagten Transkripten kommerziell zur Verfügung (<http://www.affymetrix.com>).

1.3.1 Die Fruchtfliege ist ein günstiges Modelltier für bioinformatische Analysen

Die Fruchtfliege war einer der ersten mehrzelligen Modellorganismen, für den eine vollständige Genomsequenz zur Verfügung stand. Die anfallenden Daten wurden mit Methodiken verarbeitet, die sich schon in der Analyse des Hefegenoms bewährt hatten (Lewis et al., 2002; Mungall et al., 2002), und direkt in die auf GO basierende Datenbank FlyBase (<http://www.flybase.org>; FlyBase Consortium, 2003) übernommen, die schon vorher Informationen zu genetischen Interaktionen und Annotationen

zu einzelnen Genen in *Drosophila* enthielt. Sämtliche Daten sind für die akademische Gemeinschaft frei ladbar.

Mittlerweile ist die dritte überarbeitete Version des Genoms von *Drosophila* verfügbar (Celniker et al., 2002). Bioinformatische Analysen, zusammen mit den Daten sämtlicher cDNAs aus *Drosophila* (Stapleton et al., 2002), erlauben eine Vorhersage von 13.379 Genen (Misra et al., 2002) sowie deren molekulargenetische Struktur. Basierend auf den Daten der zweiten Version wurden Transkriptomanalysen von 4.028 Genen zu 66 verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung durchgeführt (Arbeitman et al., 2002). Zusammen mit der genomweiten systematischen Expressionsanalyse mittels automatisierter *in situ*-Hybridisierungen (Tomancak et al., 2002) stehen so nun auch die Aktivitätsphasen vieler Gene fest. Durch den Zusammenschluss zwischen Industrie und Forschung wurden in einem Hochdurchsatzverfahren für *Drosophila* Protein-Protein-Interaktionsdaten von mehr als 4.500 Proteinen ermittelt und digital verfügbar gemacht (Giot et al., 2003). Der nächste Schritt in der Analyse der Gene werden genomweite siRNA-Bibliotheken sein (Carpenter und Sabatini, 2004), die auf Mikrotiterplatten ausgeliefert werden und die parallele „knock-out“-Untersuchung an Zellkulturen erlauben.

Plattformen zur Transkriptomanalyse sind von mehreren akademischen und industriellen Herstellern verfügbar und werden intensiv genutzt. Es sind mittlerweile mehr als 150 Publikationen mit genomweiten Expressionsanalysen von *Drosophila* unterschiedlicher Genotypen und Entwicklungszeitpunkte veröffentlicht. Viele der Rohdaten sind frei und für eigene weiterführende Analysen verfügbar, beispielsweise über die Datenbanken GeneOmnibus (Edgar et al., 2002) oder ArrayExpress (Brazma et al., 2003).

Die eindeutige genetische Nomenklatur für *Drosophila*, die freie Verfügbarkeit von Hochdurchsatzdaten sowie die zentrale Organisation der Daten über die standardisierte GO-Sprache machen die Fruchtfliege zu einem günstigen Modelltier für weiterführende bioinformatische Analysen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der FGF-Rezeptor BTL und sein Ligand BNL sind essentiell für verschiedene Prozesse während der trachealen Morphogenese in der Fruchtfliege *Drosophila*. Viele molekulare Grundlagen der Signalübertragung sind geklärt, die transkriptionell aktivierten Zielgene am Ende der Signalkaskade allerdings weitgehend unbekannt. Betrachtet man die diversen Funktionen von BNL in der Tracheogenese, so erwartet man Gene, die für Funktionen in der Zellmigration, zelluläre Elongation, zelluläre Gestalt und Spezifikation bestimmter trachealer Subtypen kodieren (vgl. Kapitel 1.2.2).

Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Drosophila* stehen Werkzeuge zur funktionellen Genomik zur Verfügung. Dies bezeichnet genomweite Untersuchungen zum Netzwerk genetischer Interaktionen und Abhängigkeiten sowie der Identifikation der einfachsten funktionellen genetischen Einheiten, der Gene. Eine Methode ist dabei die genomweite Transkriptomanalyse, mittels

der man den Aktivitätsstatus aller Gene innerhalb einer RNA-Probe (semi-)quantitativ vergleichen kann.

Die Transkriptomanalyse soll eingesetzt werden, um putative Zielgene der FGF-Signalkaskade in *Drosophila* zu identifizieren. Am Beispiel von BNL soll geprüft werden, ob (a) die Transkriptomanalyse ein geeignetes Werkzeug dafür ist, und (b), was die Zielgene der FGF-Signalkaskade im Tracheensystem von *Drosophila* sind. Der Faktor BNL eignet sich vor allem deshalb, da die Tracheogenese morphologisch und genetisch schon tiefgehend beschrieben ist. Daher bietet sich ein Vergleich von Funktionsverlust, wildtypischer Situation und Überexpression von BNL sowohl auf morphologischer Ebene als auch insbesondere auf transkriptioneller Ebene an.

Bioinformatische Methoden werden benötigt, um aus der Menge an anfallenden Daten der Transkriptomanalyse die Informationen der größten biologischen Relevanz herauszufiltern. Sämtliche systematisch strukturierbaren genetischen Informationen zur Biologie der Fruchtfliege sind digital in Datenbanken verfügbar. Es soll ein Werkzeug geschaffen werden, das die differenzielle Genexpression aus den Experimenten an BNL mit den Informationen aus den Datenbanken korrelieren kann, womit eine genauere Beschreibung der Zielgene der FGF-Signalkaskade angestrebt wird.

Auch ist es wünschenswert, Transkriptomanalysen nicht nur deskriptiv zu betreiben, sondern eventuell die grundlegenden Mechanismen der genetischen Regulation zu erkennen. Dies ist die anspruchvollste Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen jeweils mit einem einleitenden Abschnitt, den benutzten experimentellen Parametern und den entsprechenden Beobachtungen dargestellt werden. Technische Details zur Durchführung und zum benutzten Material sind dem Methodenteil zu entnehmen.

2.1 Morphologische Analyse der Missexpression von branchless

Der tracheale Phänotyp der Mutantenlinie *bnl^{P1}* (Sutherland et al., 1996) sowie morphologische Aspekte der Überexpression von *bnl* im Embryo mittels des GAL4/UAS-Systems wurden bereits beschrieben: So wurde zunächst gezeigt, dass ektopische Expression von *bnl* im gesamten Ektoderm mittels 96B-GAL4 zu einer Vielzahl von trachealen Verzweigungen führt (Sutherland et al., 1996), dass die Bildung des dorsalen Hauptstammes von dieser Überexpression nur wenig betroffen ist (Wolf und Schuh, 2000; Wolf et al., 2002), und dass die ektopische Expression von BNL während der Morphogenese das dynamische Muster von filopodialen Zellausläufern verändern (Ribeiro et al., 2002).

2.1.1 Betrachtung des Tracheensystems in der Funktionsverlust-Mutanten *bnl^{P1}* und in der Überexpression

Wildtypische Embryonen, solche der Mutantenlinie *bnl^{P1}* sowie Embryonen des Genotyps *btl-GAL4; UAS-bnl^l* wurden vor der Transkriptomanalyse einer immunhistochemischen Färbung mit dem trachealen Lumenmarker 2A12 unterzogen (siehe **Abbildung 7**). Der Treiber *btl-GAL4* ist vom Beginn der Tracheogenese bis zum Ende des Stadiums 16 in allen Tracheenzellen stark aktiv. Die Färbung der Tracheen diente einerseits zur phänotypischen Kontrolle, ob die verwendeten Linien dem angegebenen Genotyp entsprachen, andererseits ermöglichte die Untersuchung eine genauere vergleichende Betrachtung morphologischer Details. Durch die Anwendung einer transversalen Projektionstechnik zeigt sich so beispielsweise, dass durch die Überexpression von BNL eine Vielzahl sehr dünner und langer tubulärer Ausläufer bis tief ins Viszerum des sich entwickelnden Embryos vordringen (siehe **Abbildung 7 D**). Dies kann im Wildtyp in dieser Form nicht beobachtet werden, da dort das embryonale Tracheensystem hauptsächlich eine Spange um das Viszerum formt (siehe **Abbildung 7 F**). Weiterhin zeigen sich verschiedene Ausprägungen des Überexpressionsphänotyps (siehe **Abbildung 8**). Betrachtet man Embryonen des Stadium 17, so erkennt man durch Färbung mit 2A12 zwei verschiedene Phänotypen: In einem ist die Grundstruktur des dorsalen und des lateralen Hauptstammes noch erhalten (siehe **Abbildung 8 D**), in der anderen Form ist vom stereotypen

¹ Der formal richtige Genotyp der Kreuzung lautet *+ / UAS-bnl; + / btl-GAL4; + / +*. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und um der Logik des GAL4/UAS-Systems gerecht zu werden, wird er in der vorliegenden Arbeit als *btl-GAL4; UAS-bnl* aufgeführt werden. Ebenso wird dieser Term wie ein Adjektiv eingesetzt werden, z.B. *btl-GAL4; UAS-bnl* Embryonen. Für andere Kreuzungen wird analog verfahren, tatsächliche chromosomale Lokalisationen genetischer Merkmale sind dem Methodenteil zu entnehmen.

Grundmuster des Tracheensystems nur noch der dorsale Stamm vorhanden (siehe **Abbildung 8 C**). Wie es zu den unterschiedlichen Formen der Ausprägung kommt, ist unklar, da eine entsprechende Unterteilung in früheren Stadien von Embryonen des gleichen Genotyps nicht beobachtet werden kann. Grundsätzlich erscheint es, als würde zunächst das wildtypische Entwicklungsprogramm durchlaufen, in dem die trachealen Metamere aufeinander zuwachsen und im Stadium 14 durch Fusion den durchgehenden dorsalen Hauptstamm bilden (siehe **Abbildung 8 A**). Die Ausbildung anderer primärer Äste ist aber stark gestört, statt dessen erkennt man die Ausbildung einer Vielzahl kleiner Äste aus dem dorsalen Hauptstamm, die im Verlauf der weiteren Entwicklung immer länger werden und verzweigen (siehe **Abbildung 8 B**). Nur in seltenen Fällen bleibt das tracheale Grundmuster so erhalten, dass der laterale Hauptstamm zu erkennen ist (siehe **Abbildung 8 D und D'**).

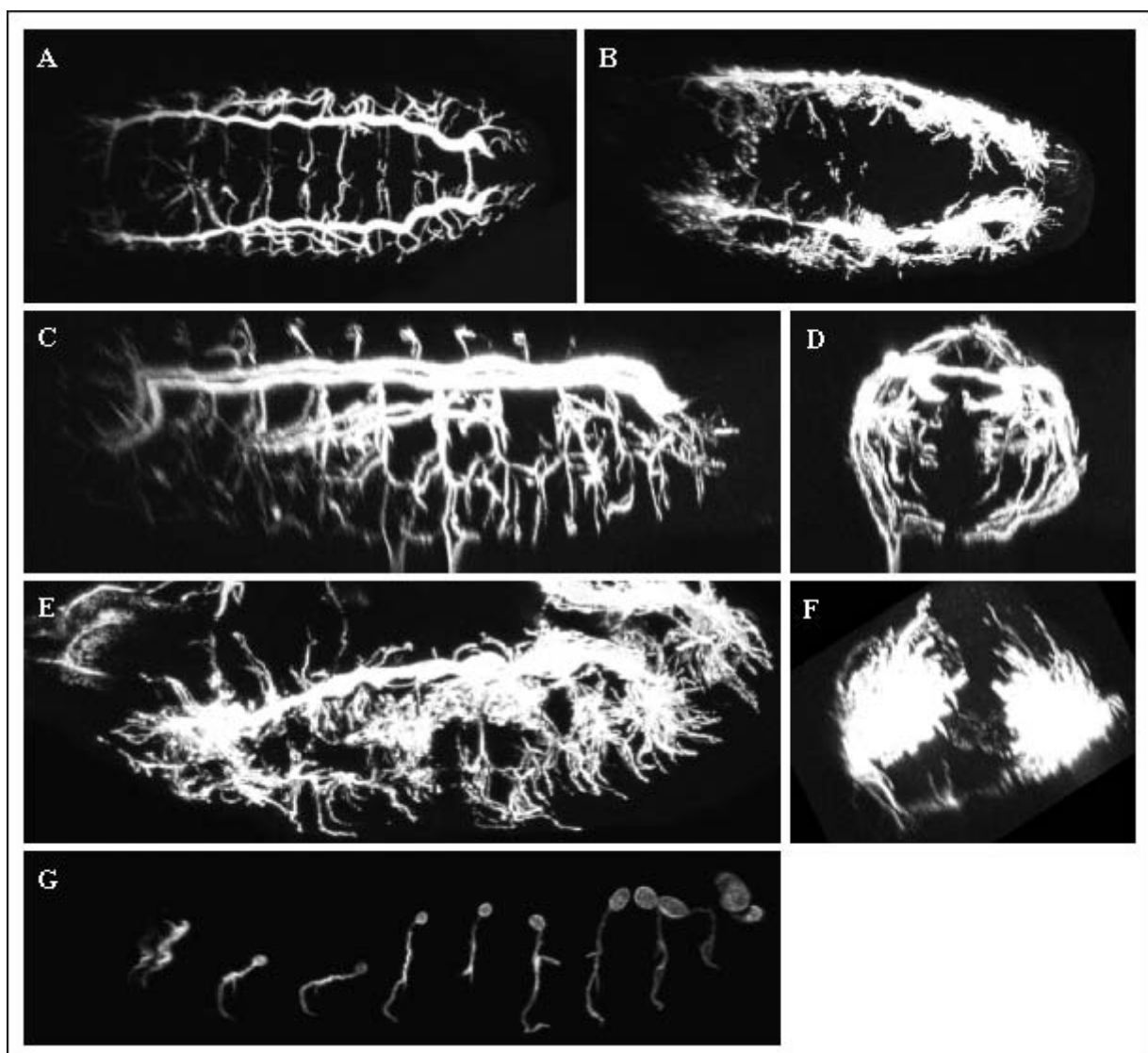


Abbildung 7: Konfokale Projektionen immunhistochemischer Anfärbungen des Tracheensystems mit dem spezifischen Lumenmarker 2A12 in Embryonen verschiedener Genotypen im Stadium 17. Die Aufnahmen (A), (C) und (D) zeigen das wildtypische Tracheensystem, (B), (E), und (F) das Resultat der Überexpression von BNL sowie (G) die Tracheenrudimente im *bnl^{P1}* mutanten Embryo. (A) und (B) sind tatsächliche dorsale Aufnahmen, (C) eine rekonstruierte Projektion der Medianebene von (A) sowie (D) und (F) aus (A) und (B) rekonstruierte transversale Projektionen. Bei (E) und (G) handelt es sich um tatsächliche laterale Aufnahmen. Man erkennt die stereotype Struktur des wildtypischen Tracheensystems mit den dorsal

verlaufenden trachealen Hauptstämmen, den nach unten abzweigenden Transversverbindungen, die dem lateralen Hauptstamm sowie den viszerale Ästen als Substrat dienen. In der transversalen Projektion erkennt man deutlich, dass das Tracheensystem das Viszerum der Embryonen wie eine Spangenstruktur umspannt. Durch die Überexpression von BNL ist das stereotype Verzweigungsmuster stark gestört. Stattdessen treten eine Vielzahl sehr dünner aber extrem langer Tracheenäste auf, die vom dorsalen Hauptstamm auswachsen und bis tief ins Viszerum vordringen. In der Mutantenlinie wiederum migrieren die Tracheenzellen kaum aus und es bleibt segmental zumeist eine kleine Gruppe von Tracheenzellen zurück, die nur über einen einzigen tubulären Ausläufer verfügen.

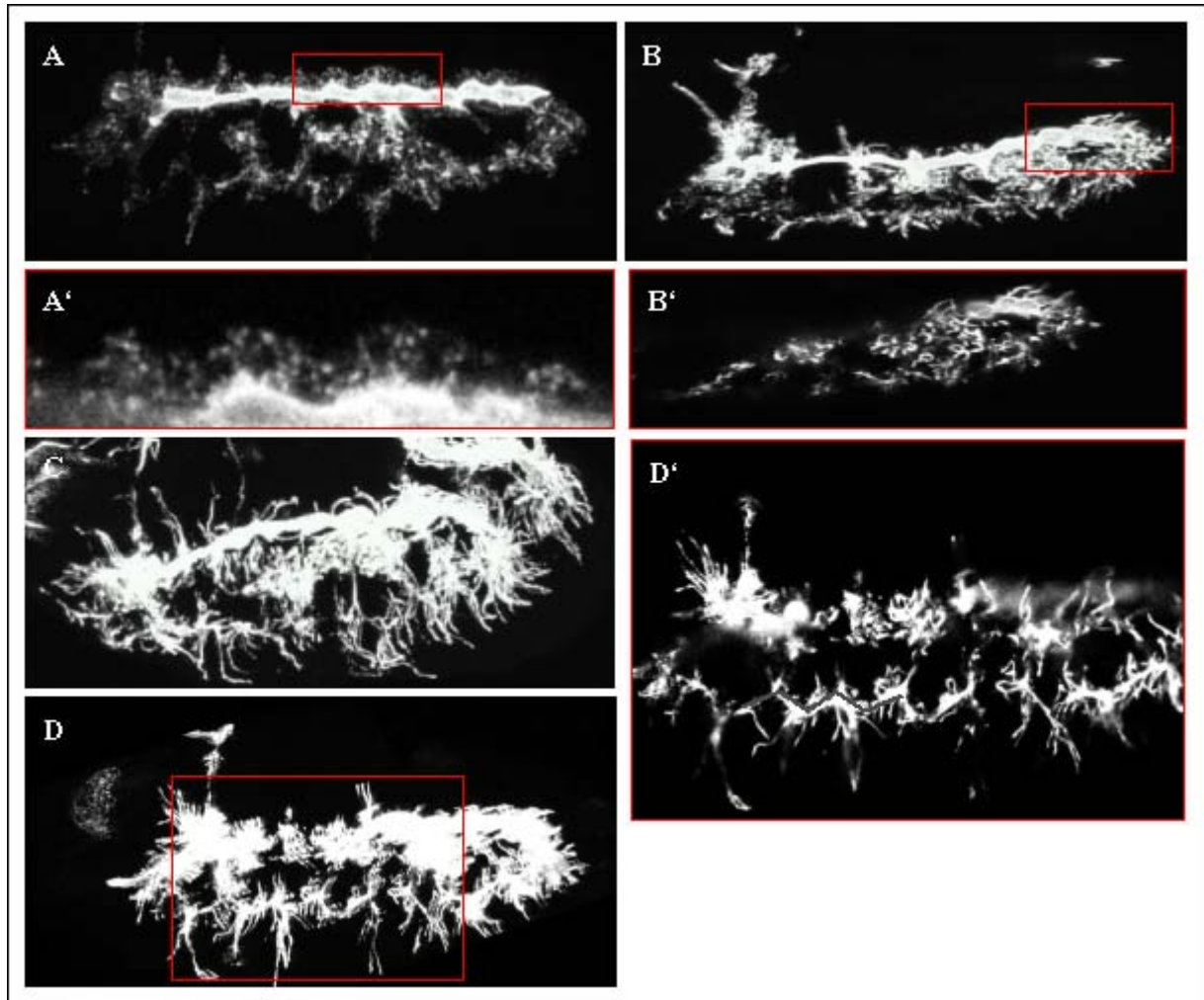


Abbildung 8: Laterale konfokale Projektionen immunhistochemischer Anfärbungen des Tracheensystems mit dem spezifischen Lumenmarker 2A12 in *btl-GAL4; UAS-bnl* Embryonen. (A) Stadium 15. Dem Entwicklungsstadium entsprechend, sind die trachealen Metamere fusioniert und bilden den dorsalen Hauptstamm aus. Die Transversverbindungen sind hingegen nur rudimentär gebildet. Man erkennt eine Vielzahl kleiner Tracheenäste, die aus dem dorsalen Hauptstamm abgeleitet sind. (A') zeigt eine Detailvergrößerung. (B) Stadium 16. Der dorsale Hauptstamm erscheint dünner im Vergleich zum vorangegangenen Stadium. Anstelle der Transversverbindungen haben sich eine Reihe kleiner Tracheenäste gebildet, die sich ungeordnet überlagern. Derartige Überkreuzungen sind im Wildtyp nur selten, und dann nur bei terminalen Tracheenästen zu beobachten. (B') zeigt als Detail eine Ebene der Projektion. Prominent ist die besonders lange Ausbildung des pharyngealen Astes, der besonders stark auf BNL zu reagieren scheint. (C) und (D) Stadium 17. Der typische späte Phänotyp (C) der Überexpression von BNL ist gekennzeichnet von einer Vielzahl langer und dünner Tracheenäste, die alle vom dorsalen Hauptstamm auszugehen scheinen. Seltener tritt ein milderer Phänotyp (D) auf, in dem sich manche Tracheenäste zum lateralen Hauptstamm verbinden konnten. (D') zeigt eine Konfokalebene der Projektion, der typische Zickzackverlauf des lateralen Hauptstammes ist in Graustufen angedeutet.

Der Antikörper 2A12 färbt nur das tracheale Lumen. Um das zelluläre Erscheinungsbild der Tracheen darzustellen, wurden *btl*-GAL4; UAS-GFP; UAS-*bnl* Embryonen lebend beobachtet, und *btl*-GAL4; UAS-*lacZ*; UAS-*bnl* Embryonen mit dem Lumenmarker 2A12 beziehungsweise Antikörper gegen β -Galaktosidase immunhistochemisch angefärbt (siehe **Abbildung 9**).

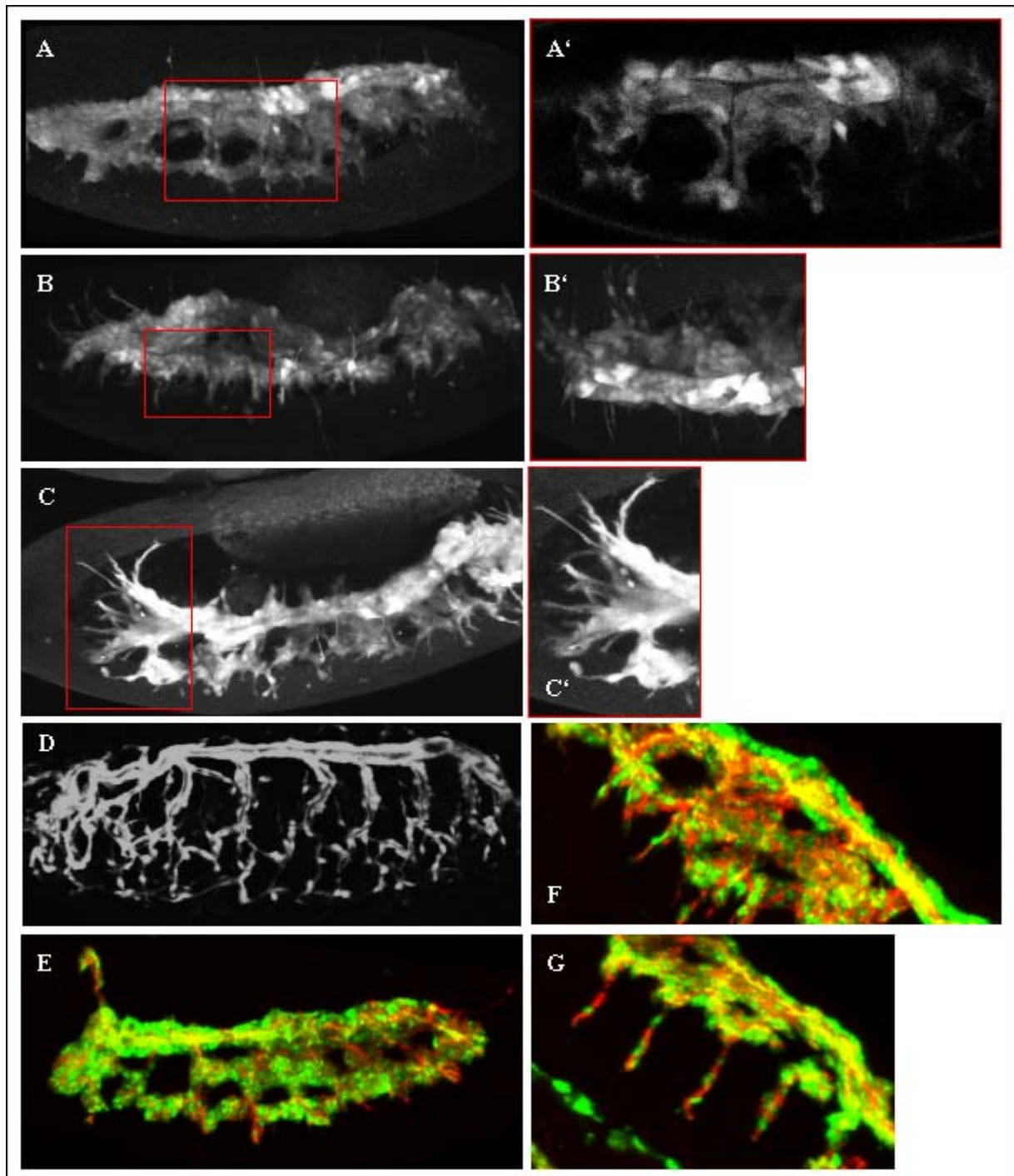


Abbildung 9: Embryonen verschiedener Stadien aus den Kreuzungen *btl*-GAL4 x UAS-*bnl* im genetischen Hintergrund von UAS-GFP (A bis D) und UAS-*lacZ* (E bis G). Aus den Kreuzungen können sowohl Embryonen mit dem Genotyp UAS-*bnl*; UAS-GFP (oder UAS-*lacZ*); *btl*-GAL4 als auch UAS-GFP (oder UAS-*lacZ*); *btl*-GAL4 hervorgehen. Die angegebenen Genotypen sind daher nur putativ aus dem trachealen Phänotyp abgeleitet. (A bis D) **Fluoreszenz GFP-markierter Embryonen.** Die Embryonen wurden dechorioniert und unter Öl lebend am Konfokalmikroskop beobachtet. Gezeigt sind Projektionen lateraler Aufnahmen. (A bis C) zeigen Embryonen der Stadien 15 bis 17 mit dem Genotyp UAS-*bnl*; UAS-GFP;

btl-GAL4, **(D)** ist eine wildtypische Kontrolle im Stadium 17. Während das zelluläre Erscheinungsbild im Wildtyp weitgehend dem einer Anfärbung mit dem Lumenmarker 2A12 entspricht und sich die Zellen nach stereotypischen Muster im Embryo verteilt haben, erkennt man in der Überexpressionssituation hauptsächlich eine zusammenhängende Zellmasse, die nicht der fein verzweigten Tracheenmarkierung aus der Anfärbung mit 2A12 entspricht. **(A')** ist eine Konfokalebene der Projektion **(A)** und zeigt das Lumen des dorsalen Hauptstammes sowie der Anlage der Transversverbindung. In **(B)** und **(C)** sowie der entsprechenden einzelnen Projektionsebene **(B')** und Detailvergrößerung **(C')** erkennt man extrem lange zytoplasmatische Ausläufer, die im Wildtyp in dieser Länge so nicht beobachtet werden können. **(E bis G). Laterale Projektion immunhistochemischer Doppelfärbung mit 2A12 (Kanal: rot) und anti-β-Galaktosidase Antikörpern (Kanal: grün).** Die gezeigten Aufnahmen stammen von Embryonen der Stadien 15 **(E)** und 16 **(F und G)**, die der Überexpressionssituation entsprechen. Man erkennt in drei Fällen **(E, F und G)**, dass die Färbung des Lumenmarkers weit über die Anfärbungen des trachealen Zytoplasmas hinausgeht.

Die Markierung der Tracheenzellen durch GFP oder Antikörperfärbung gegen die Reporter-β-Galaktosidase deuten an, dass ihr natürliches Migrationsverhalten durch die Überexpression von BNL zum Erliegen kommt. Das tracheale zelluläre Grundmuster lässt im Wildtyp eine Organisation erkennen, die der Lumenfärbung entspricht (vergleiche **Abbildung 7 C**). Die Zellen sind entsprechend ihrer Identität als Bestandteil des dorsalen Hauptstammes und der Transversalverbindung etc. im Embryo angeordnet. Durch die Überexpression von BNL hingegen verbleiben sie weitgehend in einem engen Verband, einzig zytoplasmatische Ausläufer ragen bis weit in den Embryo hinein. Ebenso wie bei der Anfärbung des Lumens zeigt sich auch hier, dass der pharyngeale Tracheenast besonders auf das Signal zu reagieren scheint und ungewöhnlich lange Ausläufer bis in den Bereich der Gehirnanlage entsendet.

Die gleichzeitige Anfärbung der Tracheenzellen und des Lumens lässt erkennen, dass die Färbung mit dem lumenspezifischen Marker viel deutlicher die tracheale Struktur darlegt als eine entsprechende zellspezifische Färbung. Die feinen Tracheenlumina sind in der Überexpression² (vergleiche **Abbildung 8**) der bessere Marker für die Analyse des Tracheensystems. Man kann vermuten, dass diese Lumina nur von einem dünnen zellulären Saum umgeben werden, und so im Mikroskop kaum oder nur schwer sichtbar gemacht werden können. Dies ist beispielsweise auch bei Terminalzellen des Wildtyps der Fall, bei denen ein intrazelluläres Lumen gebildet wird, und die Zelle bis auf einen kleinen Saum um das Lumen reduziert wird (vergleiche **Abbildung 10**).

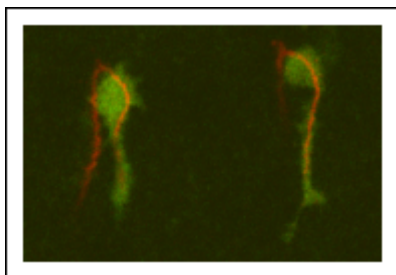


Abbildung 10: Immunhistochemische Doppelfärbung von Terminalzellen zweier dorsaler Tracheenäste eines *srf*-GAL4; UAS-*lacZ* Embryos der Kreuzung mit 2A12 (Kanal: rot) und anti-β-Galaktosidase Antikörpern (Kanal: grün). Man erkennt, dass ein Grossteil des trachealen Lumens nur von einem dünnen zellulären Saum umgeben ist, der mikroskopisch nur teilweise aufgelöst werden kann.

² Sprachlich richtiger wäre: in der Überexpressionssituation. Im Kontext der vorliegenden Arbeit impliziert „die Überexpression“ oder „die Mutante“ die entsprechende Situation.

2.1.2 Die Überexpression von branchless induziert tracheale Terminalzellidentität in fast allen Tracheenzellen

Basierend auf der Analyse molekularer Marker wurde BNL als Vermittler sekundärer und terminaler Verzweigungsprozesse diskutiert (Sutherland et al., 1996). Die in dieser Arbeit vorgestellte morphologische Analyse des Überexpressionsphänotyps verleitet ebenfalls zur Annahme, dass BNL in der Überexpression in bestimmten Zellen die Ausdifferenzierung zu Terminalzellen vermitteln könnte. Dafür sprechen die ungewöhnlich langen und dünnen Tracheenäste in der Überexpression sowie die Tatsache, dass die meisten Zellkörper in engem Verband liegen und nur feine zytoplasmatische Ausläufer in den Embryo hineinragen.

Für die Überprüfung dieser Hypothese und für eine genaue Quantifizierung der Umdifferenzierung wurden *srf-lacZ*; *btl*-GAL4; UAS-*bnl* Embryonen immunhistochemisch mit anti- β -Galaktosidase Antikörper gefärbt. Der Reporter *srf-lacZ* diente als molekularer Marker für Terminalzellen. Die Anzahl *srf-lacZ* positiver Zellen wurde für Embryonen verschiedener Stadien durch computergestützte Zellzählung in konfokalen Bildstapeln bestimmt (siehe **Abbildung 11**).

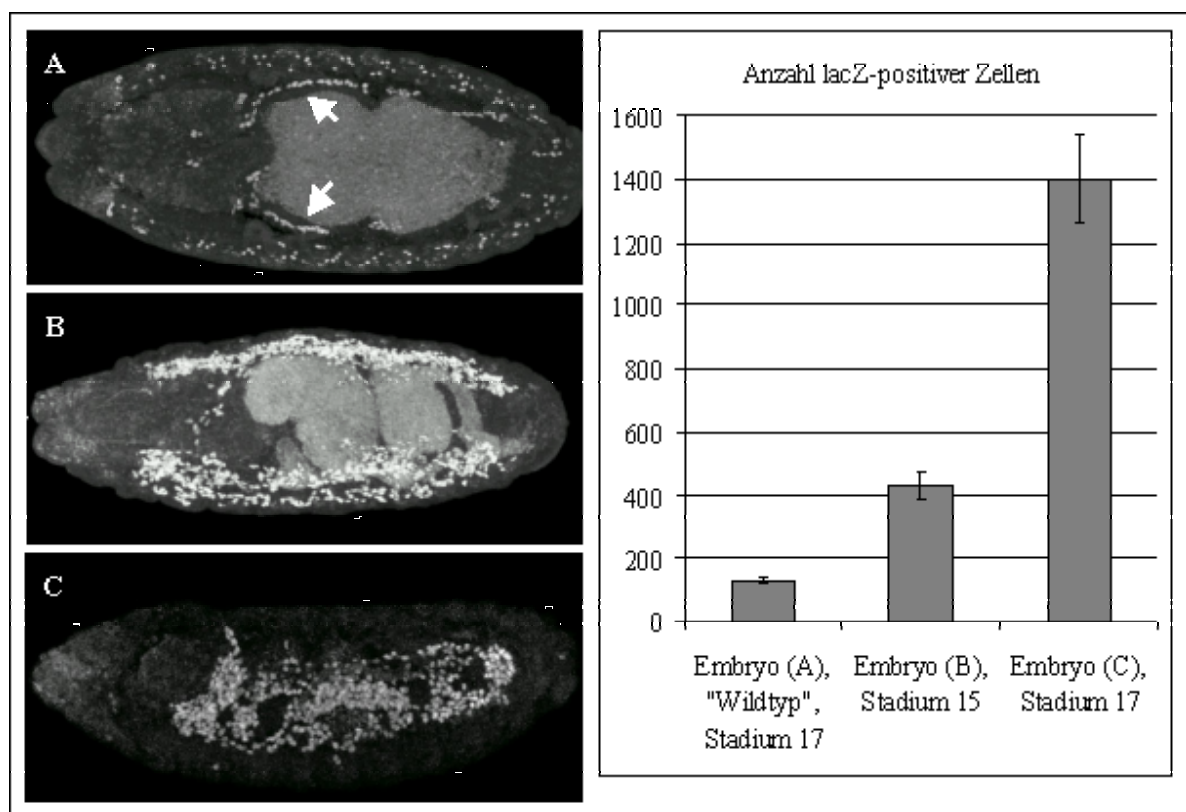


Abbildung 11: Projektion der immunhistochemischen Markierung *srf-lacZ*-positiver Zellen und ihre Quantifizierung in verschiedenen Embryonen. Alle Embryonen entstammen der Kreuzung *srf-lacZ*; *btl*-GAL4 x UAS-*bnl*. Die Identifikation als Wildtyp (A) oder als Embryo in der Überexpression (B und C) erfolgte aufgrund des Phänotyps. (A) **Wildtyp im Stadium 17.** Der Reporter *srf-lacZ* ist nicht exklusiv für Terminalzellen, sondern färbt auch einige Zellen des viszeralen Mesoderms an (weiße Pfeile, umgeben den Darm spangenartig). Alle anderen *srf-lacZ*-positiven Zellen haben tracheale Identität (Daten nicht gezeigt). (B und C) **Embryonen der Stadien 15 und 17 in der Überexpressionssituation.** Die Anzahl der *srf-lacZ*-positiven Zellen ist deutlich größer als im Wildtyp. Diese Zellen haben tracheale Identität (Daten nicht gezeigt). **Grafik.** Mittelwerte aus der computergestützten Zellzählung in konfokalen Bildstapeln. Für jeden Embryo wurden zwei Parametersätze bei der Objekterkennung verwendet.

Eine exakte Bestimmung der Zellzahl war mit dem computergestützten Verfahren nicht möglich, da benachbarte Zellen zuweilen als nur ein Objekt gezählt werden. Die ermittelten Daten stellen demnach nur Größenordnungen dar. Es zeigt sich dennoch, dass die Anzahl der *srf-lacZ*-positiven Zellen in der Überexpression deutlich zunimmt. Bereits in Embryonen des Stadiums 15 haben mehr als dreimal so viele Zellen terminale Identität als im Wildtypembryo im Stadium 17 (430 Zellen im Vergleich zu 130 Zellen). Die Bildung von Terminalzellen nimmt im Laufe der Entwicklung in der Überexpression noch zu, da zum Ende des Stadiums 17 mit rund $1,4 \times 10^3$ *srf-lacZ*-positiven Zellen fast 90% der schätzungsweise $1,6 \times 10^3$ Tracheenzellen in putative Terminalzellen umdifferenziert sind.

Man nimmt an, dass der terminale Zelltyp über ein Zwischenstadium sekundärer Identität vermittelt wird. Molekularer Marker für dieses Stadium ist der ETS-Transkriptionsfaktor POINTED, dessen Expression mittels einer Reporterlinie *pnt-lacZ* überprüft werden kann. Tatsächlich erkennt man in *pnt-lacZ; btl-GAL4; UAS-bnl* Embryonen nach immunhistochemischer Anfärbung des Reporters eine deutliche Zunahme von *pnt-lacZ*-positiven Zellen (Daten nicht gezeigt).

2.1.3 Die Überexpression von *BRANCHLESS* in Tracheenzellen ist letal

Die Mutantenlinie *bnl*^{P1} ist homozygot letal, die Mutation wird daher für die langfristige Haltung genetisch über ein Balancierchromosom stabilisiert. Auch *btl-GAL4; UAS-bnl* Embryonen sind selten voll entwicklungsfähig. Es zeigt sich, dass sich nur 2 von 836 der für die Analyse eingesetzten Embryonen bis zum Adult (beide männlich) entwickeln. Die meisten Tiere sterben im ersten Larvenstadium, das mit fünf Tagen deutlich länger dauert als im Wildtyp, und sind in ihrer Lokomotion deutlich eingeschränkt. Dies erscheint zunächst unschlüssig, wenn man alleine die Morphologie der Embryonen vergleicht. Schließlich wird in der Überexpression im Vergleich zu Funktionsverlustmutanten durchaus ein Tracheensystem gebildet, so dass ein tracheale Versorgung aller Gewebe möglich sein sollte.

Da der FGF-Rezeptor BTL auch in den Glia der Mittellinie exprimiert wird (Klamt et al., 1992), stellte sich die Frage, ob die Überexpression von BNL die Morphologie des Nervensystems verändert und dies der Grund für die prämortale Bewegungslosigkeit und Letalität sein könnte. Die immunhistochemische Anfärbung von Embryonen mit den Antikörpern BP102, BP106 und anti-FASCICLIN II Antikörper zeigte allerdings keine offensichtliche anomale Entwicklung des embryonalen Nervensystems (Daten nicht gezeigt).

Die Überexpression von BNL löst auch keinen kontrollierten Zelltod in anderen als den sonst absterbenden Zellen aus, wie im Vergleich zu wildtypischen Embryonen in einem TUNEL-Test gezeigt wurde (Daten nicht gezeigt).

2.1.4 Nach Überexpression von *BRANCHLESS* in den Tracheenzellen erfolgt keine tracheale Gasfüllung

Bei der eingehenden morphologischen Betrachtung von Embryonen und frühen Larven in der Überexpression fiel auf, dass bei diesen Tieren die Gasfüllung am Ende der Embryogenese ausbleibt (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass durch die Induktion der ektopischen Terminalzellen zwar ein hochkomplexes, wenn auch untypisches, Tracheensystem gebildet wird, dieses aber offensichtlich seine physiologische Funktion nicht ausüben kann. Um zu überprüfen, ob dies ein Grund für die Letalität der Tiere in der Überexpressionssituation sein könnte, musste zunächst getestet werden, ob die Gasfüllung für die Physiologie später Embryonen tatsächlich wichtig ist.

Die fehlende Gasfüllung nach ektopischer Expression von *BRANCHLESS* ist physiologisch relevant. Im Wasserfloh *Daphnia magna* (Straus) kann der Oxygenierungsstatus verschiedener Gewebe durch NADH-Fluoreszenz und Hämoglobin-Absorption bestimmt werden (Baumer et al., 2002). Ebenso stehen sauerstoffabhängige Farbstoffe (Dunphy et al., 2002) zur Verfügung, mit denen nach Injektion der tatsächliche Sauerstoffpartialdruck *in vivo* (Pirow et al., 1999; Pirow et al., 2004) bestimmt werden kann. In enger Zusammenarbeit mit Dr. Ralph Pirow, Universität Münster, wurde die dort entwickelte Methodik für eine Untersuchung des endogenen Sauerstoffpartialdrucks in Embryonen von *Drosophila* angepasst. Die Methode wurde bis dato noch nicht für landlebende Invertebraten beschrieben, und daher erfolgt an dieser Stelle auch die methodische Beschreibung als Ergebnis.

Im ursprünglichen Messaufbau für die Untersuchungen an *Daphnia* wurde die Messkammer mit sauerstoffgesättigtem Wasser durchflossen. Für entsprechende Untersuchungen an *Drosophila* wurden statt dessen durch ein auf 25 °C temperiertes Wasserbad verschiedene Gasgemische aus beliebigen Verhältnissen von Raumluft und Stickstoff zugeleitet (siehe **Abbildung 12** zur Methode und Apparatur). Da Embryonen für die Injektion des Farbstoffes Oxyphor R2 dechorioniert werden mussten, war als Schutz vor Austrocknung eine Überschichtung der Tiere mit Voltalef Öl notwendig. Dies erfordert längere Messzeiten pro Sauerstoffpartialdruck, damit sich auch mit der Ölbarriere ein Gleichgewicht einstellen konnte.

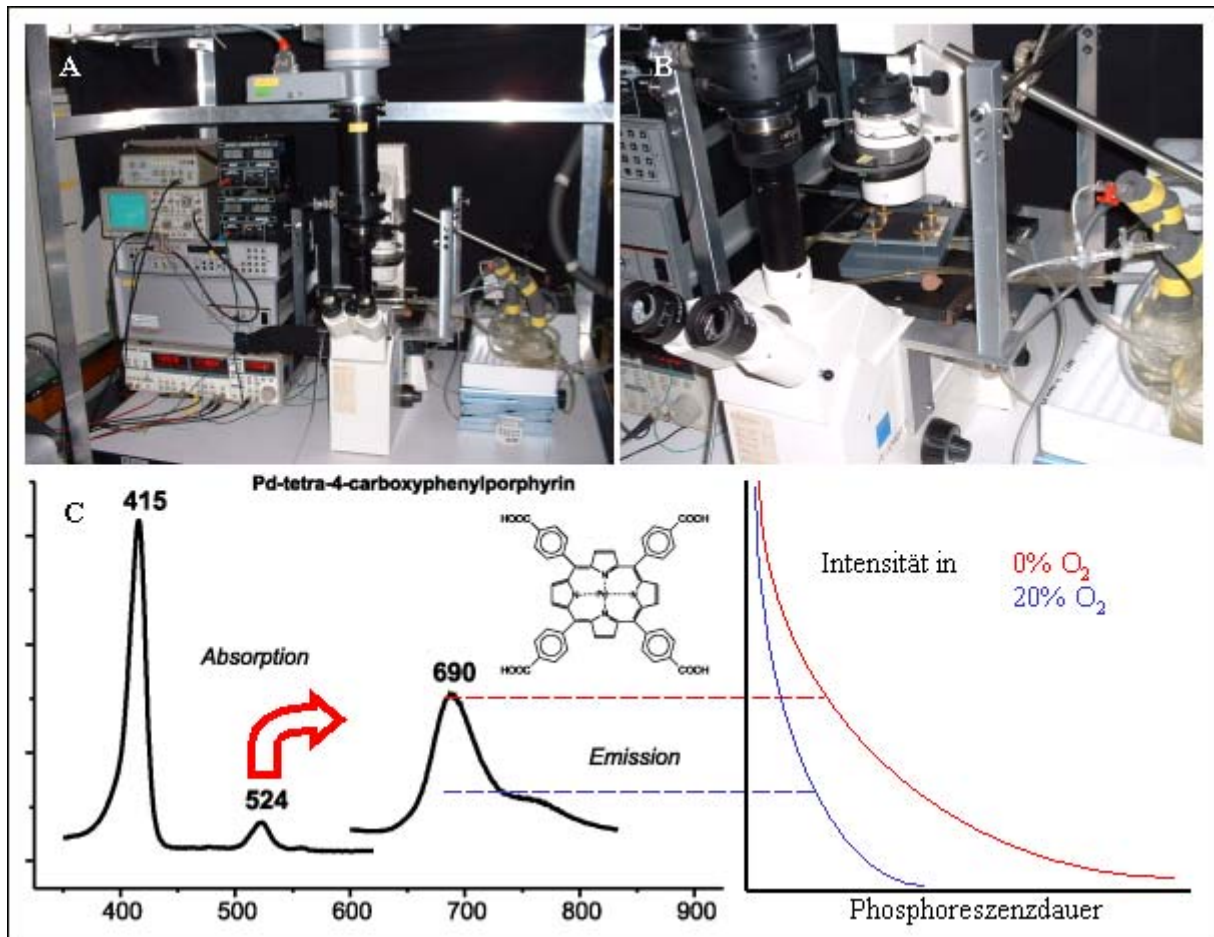


Abbildung 12: Messplatz (A und B) und Messprinzip (C) der optophysiologicalen Untersuchungen.

Details zum Aufbau und den Einzelkomponenten finden sich im Methodenteil. (A) **Messplatz.** Die injizierten Embryonen werden unter einem inversen Mikroskop (Mitte) beobachtet. Sie befinden sich in einer Messkammer, die durch temperierte und befeuchtete Gasmischungen (die Befeuchter sind rechts zu sehen) durchflossen wird. Das Phosphoreszenzsignal wird von einem *Photomultiplier* (schwarz, links unten am Mikroskop) detektiert und mit einem Oszilloskop und einem *Lock-In*-Verstärker mit Frequenzanalysator verarbeitet (Geräteturm links). Die nachgeschalteten Computer zur Dokumentation befinden sich außerhalb des Bildes links. (B) **Detail der Messkammer für Embryonen.** Die Messkammer wird nach dem Einlegen der Embryonen luftdicht versiegelt, so dass nur noch definierte Gasmischungen aus den beiden Befeuchtern (links) über das Schlauchsystem zugeführt werden. Das Gasmischung durchströmt die Kammer und wird auf der anderen Seite über einen Schlauch nach außen abgegeben. (C) **Messprinzip mit Oxyphor R2 (nach Dunphy et al., 2002).** Der phosphoreszente Farbstoff absorbiert bei 524 nm und emittiert bei 690 nm. Nach einem kurzen Lichtimpuls hängen Intensität und Dauer der Phosphoreszenz davon ab, wie oft Sauerstoffmoleküle mit dem angeregten Tripletzustand des Farbstoff kollidieren. Da die Phosphoreszenzdauer im Gegensatz zur Intensität unabhängig von der eingesetzten Farbstoffmenge ist, eignet man die Methode auf die Auslöschkonstante k_q und kann somit unabhängig von der Farbstoffkonzentration vergleichende Analysen durchführen.

Zunächst wurde ein 10 μ l großer Tropfen der Injektionslösung unter einem Öltropfen für die Eichung des Systems vermessen. Dies diente der Charakterisierung des Phosphoreszenzverhalten des Farbstoffes unter Öl ohne einen Sauerstoffverbraucher und zur Abschätzung der Diffusionsdauer von O₂ durch die Ölschicht. Als längste Phosphoreszenzdauer in Abwesenheit von Sauerstoff wurde $\tau_0 = 247,3 \mu$ s gemessen, aus der linearen Regression der Messdaten in der Stern-Vollmer-Darstellung ergibt sich allerdings $\tau_0 = 212,7 \mu$ s und eine Auslöschkonstante $k_q = 432,4 \text{ mm Hg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (siehe **Abbildung 13**). Für die weiteren Berechnungen wurde $\tau_0 = 212,7 \mu$ s gesetzt. Mit den damit erhaltenen

Parametern ist über $\tau_0 / \tau - 1 = k_q \times \tau_0 \times p_0$ (wobei τ : gemessene Phosphoreszenzdauer, p_0 : Sauerstoffpartialdruck in Anoxie = 0 mmHg) eine direkte Korrelation von Phosphoreszenzverhalten und Umgebungs- pO_2 möglich. Der eventuelle Fehler in τ_0 schlägt sich nur in einer Verfälschung des absoluten pO_2 nieder und ist für vergleichende Untersuchungen irrelevant.

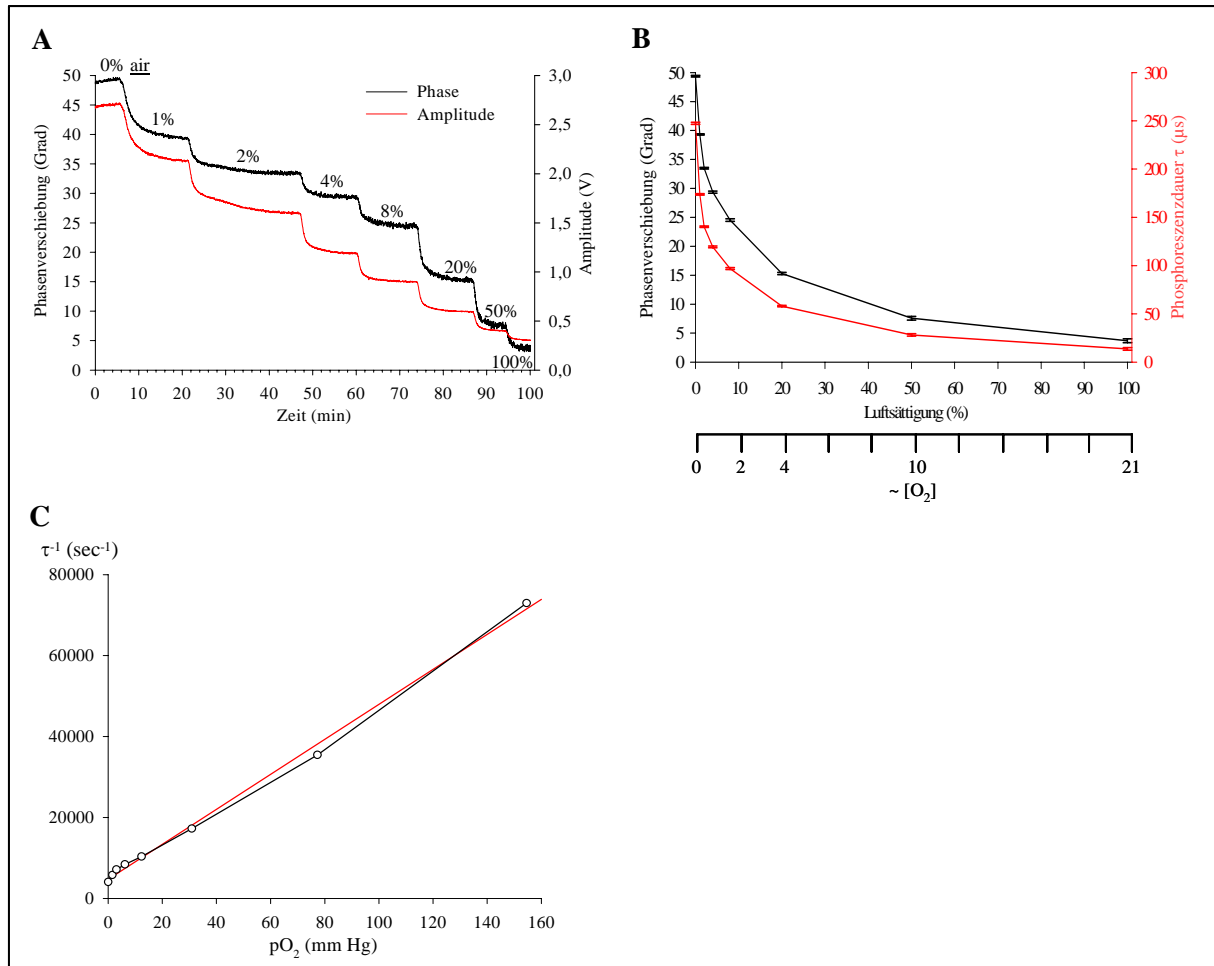


Abbildung 13: Messdaten (A) und Berechnungen (B und C) zur Eichung von Oxyphor R2 unter Öl. (A) Messdaten. Aufgezeichnet wurden bei $f = 750$ Hz Anregung und einer Empfindlichkeit von $10\text{ V} = 200\text{ nA}$ die Helligkeit der Phosphoreszenz (Amplitude des *Photomultiplier*-Signals in V) und die vom *Lock-In*-Verstärker bestimmte Phasenverschiebung ϕ zwischen dem Maximum der Phosphoreszenz (parallel zur Anregung bei 525 nm) und dem Punkt, an dem das Signal auf ein Drittel seiner ursprünglichen Intensität abgefallen ist. Die Messung wurde in Anoxie begonnen und der Anteil der Raumlaut erhöht, sobald sich das Signal stabilisiert hatte. **(B) Darstellung der Messdaten in Abhängigkeit von der Luftsättigung.** Auf zweiten Abszisse ist die ungefähre Sauerstoffkonzentration in Prozent angegeben. Die Phaseninformation ist über $\tau = \tan(\phi) / 2\pi f$ in die Phosphoreszenzdauer τ umgerechnet worden. Man erkennt die kontinuierliche Abnahme der Helligkeit und die stetig kürzer werdende Phosphoreszenzdauer. Die größte Auflösung erreicht das Verfahren demnach zwischen 0-20% Luftsättigung. **(C) Stern-Vollmer-Darstellung der Messdaten.** Aufgetragen wird der Sauerstoffpartialdruck (aus dem Luftdruck des Messtages bestimmt) gegen τ^{-1} . Die Steigung des Graphen gibt die Auslöschkonstante k_q wieder, der Achsenabschnitt τ_0 .

Der endogene Sauerstoffpartialdruck wurde für je zwei Embryonen des Wildtyps Oregon R und der Überexpression von BNL gemessen. Die Tiere wurden im Stadium 17, also nachdem die tracheale Gasfüllung im Wildtyp erfolgt war, mit Farbstofflösung injiziert, anschließend auf 4°C gelagert und

etwa eine halbe Stunde vor Beginn der Messung in die Messkammer gebracht. Tiere, bei denen die Injektion erfolgreich war, wurden am Gegenfarbstoff im Körperinneren identifiziert. Die für die Messung ausgewählten Embryonen wurden unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen ausgesetzt (siehe **Abbildung 14** und **Abbildung 15**).

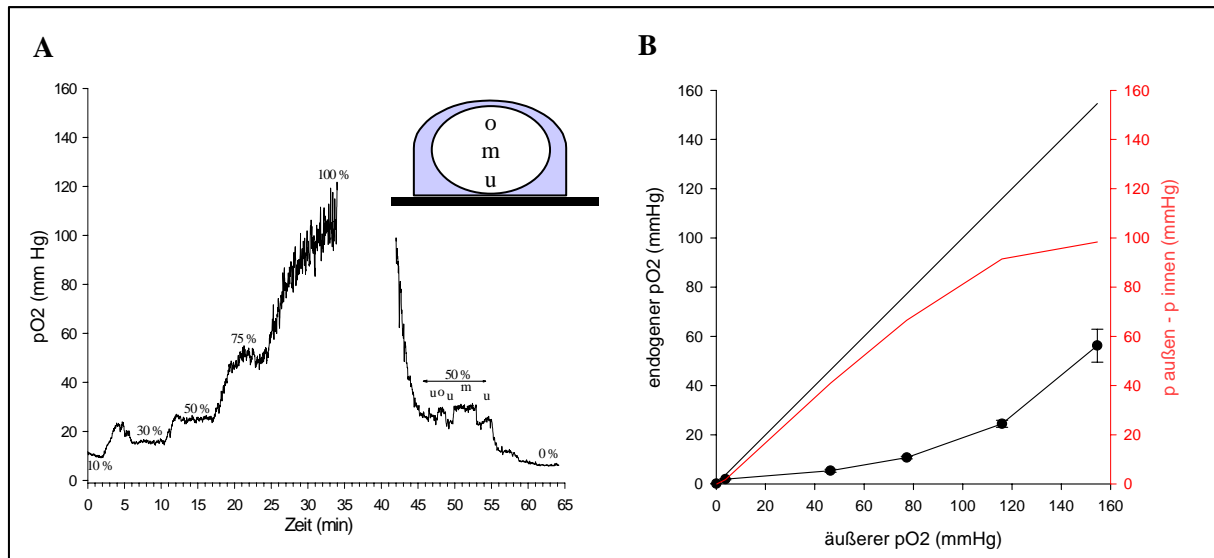


Abbildung 14: Exemplarische Messkurve für die Analyse eines Embryos (A) sowie berechneter endogener Sauerstoffpartialdruck (B). (A) **Messverlauf.** Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Partialdruckdifferenz zwischen dem Inneren des Tieres und außen. Aus Anoxie kommend (kleine Differenz zwischen innen und außen) wurde der äußere pO₂ zunächst auf 100% Raumluft erhöht (große Differenz zwischen innen und außen). Man erkennt an der Streuung der Werte, dass das Verfahren bei hohen Sauerstoffkonzentrationen sehr fehleranfällig ist. Bei 50% Raumluft wurden zusätzlich verschiedene Fokusebenen (o: oben, m: mitte, u: unten) des Embryos aufgenommen. Man erkennt, dass der endogene pO₂ unten im Embryo geringer ist als in der Mitte und oben. Dies ist eventuell mit der Geometrie des überstehenden Tropfens zu erklären (siehe Schemazeichnung), der die Diffusionsstrecke zwischen außen und dem Zielgewebe verlängert. (B). **Berechneter endogener Sauerstoffpartialdruck für einen wildtypischen Embryo.** Der äußere pO₂ ist gegen den berechneten endogenen pO₂ aufgetragen. Der eingetragene Fehler ist die Fortpflanzung der Phasendifferenzschwankung während des jeweiligen Messfensters. Die Ursprungsgerade entspräche einer Situation, in der kein Sauerstoff verbraucht wird. Die Differenz zwischen der Ursprungsgeraden und der Messkurve entspricht der Partialdruckdifferenz (dargestellt in rot), die auch in (A) verwendet wird. Man sieht, dass die Differenz bis zu einer Sauerstoffkonzentration von 10% (pO₂ ~ 80 mmHg) kaum von der Ursprungsgerade abweicht. Dies spricht dafür, dass hier kaum Sauerstoff verbraucht wird, d.h., der Metabolismus läuft auf sehr niedrigem Niveau.

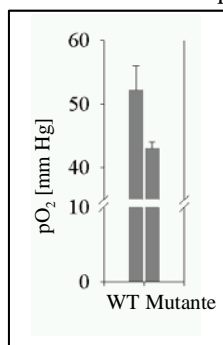


Abbildung 15: Vergleich der endogenen Sauerstoffpartialdrücke in Wildtyp und Überexpressionsmutante. Gezeigt werden die Mittelwerte jeweils zweier Bestimmungen. Außerhalb der Fehlergrenzen zeigt sich ein kleiner Unterschied von 5-10 mmHg zwischen den beiden Gruppen, was einer absoluten Sauerstoffdifferenz von etwa 1% entspricht. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist unter Beachtung der jeweiligen Fehler nach χ^2 -Statistik mit $p < 0,005$ signifikant.

Die Daten belegen, dass die Überexpressionsmutanten ohne Gasfüllung unter Normoxie einen um 5-10 mmHg niedrigeren endogenen pO₂ haben als Vergleichstiere mit Gasfüllung (Wildtyp: $56,23 \pm 6,6$ und $48,04 \pm 1,03$, Überexpressionsmutante: $42,96 \pm 1,05$ und $43,08 \pm 0,99$, alle Angaben in mmHg). Dies entspricht etwa einer absoluten Sauerstoffkonzentrationsdifferenz im Gewebe von

1%. Ob sich dieser Unterschied bereits auf den Metabolismus auswirkt, bleibt unklar. Auch wurde beobachtet, dass die Dicke der Ölschicht einen Einfluss auf die Messung hat. In welcher Größenordnung der resultierende Fehler liegt, konnte allerdings nicht bestimmt werden. Unter geringeren äußeren Sauerstoffdrücken verschwindet der Unterschied zwischen Wildtyp und Überexpressionsmutanten völlig. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass bei etwa 10% äußerer Sauerstoffkonzentration der Verbrauch sowohl in den Wildtypen als auch in der Überexpressionsmutanten deutlich abnimmt. Wahrscheinlich ist dies mit einer reduzierten metabolischen Rate zu begründen, was sich mit anderen eigenen Beobachtungen deckt, dass die Entwicklungsdauer von *Drosophila* unter Hypoxie (< 10% O₂) fast verdoppeln lässt (Daten nicht gezeigt).

2.2 Transkriptomanalysen

Hauptfokus der vorliegenden Arbeit war die Identifikation bisher unbekannter Zielgene der durch BNL ausgelösten FGF-Signalkaskade in *Drosophila*. Neben seiner Funktion im genetisch verankerten Programm der embryonalen Tracheogenese, wird BNL auch als Zielgen des durch Hypoxie aktivierten Transkriptionsfaktors SIMA diskutiert (Ghabrial et al., 2003). Bei geringen Sauerstoffkonzentrationen sorgt es für das Auswachsen terminaler Zellen in Richtung hypoxischer Gewebe (Jarecki et al., 1999). Es stellte sich zunächst die Frage, ob bereits embryonal eine zelluläre Reaktion auf Hypoxie erfolgen kann. Dafür wurde ein *Slot-Blot* mit RNAs aller Entwicklungsstadien erstellt, wobei die Spendertiere vor der Fixierung nicht, 1 h, 2 h oder 6 h unter 5% O₂ gehalten wurden. Es zeigte sich durch Hybridisierung einer Sonde für die sauerstoffabhängige Prolylhydroxylase (CG1114), dass *Drosophila* bereits ab dem embryonalen Stadium 14 eine solide Reaktion auf niedrige Sauerstoffkonzentrationen zeigt (Daten nicht gezeigt). Da Tiere in der BNL-Überexpression wiederum endogen geringere Sauerstoffkonzentrationen aufweisen, könnte so theoretisch ein ischaemischer Kreislauf entstehen. Um die einzelnen Einflüsse von BNL, seinem putativen Aktivator SIMA sowie Hypoxie im Allgemeinen zu klären, wurden eine Reihe von Transkriptomanalysen durchgeführt (siehe **Tabelle 5**). Mit dem *GeneChip*-System der Firma Affymetrix ist es im Gegensatz zu komparativen Hybridisierungsverfahren möglich, den transkriptionellen Status der Gene innerhalb einer einzigen RNA-Menge zu bestimmen (Affymetrix, 2002a). Daher sind in der späteren Analyse beliebige paarweise Vergleiche möglich.

Tabelle 5: Übersicht über die durchgeführten Transkriptomanalysen. Die Kernexperimente sind grau unterlegt. Die Tabelle gibt die RNA-Quelle, die Anzahl der durchgeführten Replikate sowie eine textliche Beschreibung der Kreuzung. Für Ablagen innerhalb eines Entwicklungsfensters wurden Embryonen für 1 oder 2 h gesammelt und dann entsprechend lange nachaltern gelassen, bevor sie in flüssigem Stickstoff fixiert und bei -80 °C gelagert wurden.

Experiment, Genotyp der RNA-Quelle	Replikate	Bemerkung
1 <i>w/w; btl-GAL4/+; +/+</i> , im Entwicklungsfenster 10-11 h	2	Referenz, etwa zum Zeitpunkt, wenn der dorsale Hauptstamm durchgängig gebildet ist
2 <i>UAS-bnl/w; btl-GAL4/+; +/+</i> , im Entwicklungsfenster 10-11 h	2	Funktionsgewinn von BNL
3 <i>w/w; btl-GAL4/UAS-sima^W; +/+</i> , im Entwicklungsfenster 10-11 h	1	Überexpression von SIMA, Fliegen von Dr. Pablo Wappner (Lavista-Llanos et al., 2002)
4 <i>w/w; btl-GAL4/+; +/+</i> , im Entwicklungsfenster 17-19 h	2	Referenz, Ende der Embryogenese
5 <i>UAS-bnl/w; btl-GAL4/+; +/+</i> , im Entwicklungsfenster 17-19 h	2	Funktionsgewinn von BNL
6 <i>+/+; +/+; bnl^{P1}/ bnl^{P1}</i> , im Entwicklungsfenster 17-19 h	2	vollständiger Funktionsverlust von BNL ³
7 <i>w/w; btl-GAL4/UAS-sima¹; +/+</i> , im Entwicklungsfenster 17-19 h	1	Überexpression von SIMA, eigenes transgenes Allel
8 <i>w/w; btl-GAL4/UAS-sima^W; +/+</i> , im Entwicklungsfenster 17-19 h	1	Überexpression von SIMA, Fliegen von Dr. Pablo Wappner (Lavista-Llanos et al., 2002)
9 Wildtyp Oregon R, im Entwicklungsfenster 16-18 h	1	Referenz, Ende der Embryogenese
10 Wildtyp Oregon R, im Entwicklungsfenster 16-18 h, vor der Fixierung für 6 h auf 5% O ₂ .	1	Wildtyp unter Hypoxie, Ende der Embryogenese

2.2.1 Qualitätskontrolle

Die Datenqualität der Transkriptomanalyse hängt von einer Vielzahl voneinander abhängiger und unabhängiger Parameter ab. Dies beginnt mit der Qualität der eingesetzten RNA, wird fortgesetzt mit Effizienz der unterschiedlichen enzymatischen Reaktionen bis einschließlich der Transkription und Fragmentierung der cRNA, und endet mit unterschiedlichen Hybridisierungseigenschaften in Abhängigkeit von der Basenkomposition, Inhomogenitäten bei der Nachweisreaktion und der computergestützten Bestimmung der Helligkeitswerte.

Zur quantitativen Beschreibung bestimmter Qualitätsmerkmale wurde nach der Bestimmung des Expressionswerts mit MASv5 die Signal/Rausch-Struktur, die durchschnittlichen Signalstärken und die Signalstärken der Kontrollen nach eigenem Protokoll vergleichend betrachtet. Das zugehörige Tabellenmaterial befindet sich im Anhang. Die Zusammenfassung dieser Daten zeigt, dass alle durchgeführten Hybridisierungen auswertbar waren und für vergleichende Analysen benutzt werden konnten (siehe **Tabelle 6**).

³ Die homozygoten Embryonen des Genotyps *bnl^{P1}* wurden per Hand aus einem Gelege des Genotyps *bnl^{P1}/TM3-GFP* unter Kaltlicht und durch Ausschluss fluoreszierender Embryonen ausgewählt. Da das fluoreszierende Protein erst gegen Ende der Embryogenese voll aktiv ist, war daher nur eine Kollektion für das embryonale Stadium 17 möglich.

Experiment	Replikat	Skalierung	Hintergrund	Signal Neg.-kontrolle	Rauschen	Ratio 5'/3'	Ratio Pos.-Kontrolle/ Hh.-Kontrolle
1	1	8,506	53,37	21,81	1,85	2,61	1,363
1	2	9,810	57,62	31,64	2,74	2,27	1,009
2	1	8,318	51,73	29,85	1,92	6,74	1,732
2	2	9,765	100,15	53,83	6,02	4,03	0,695
3	1	9,574	49,76	21,03	1,73	3,31	1,696
4	1	8,935	54,11	35,39	2,27	1,44	0,622
4	2	8,746	55,81	27,48	1,87	2,10	1,517
5	1	8,056	75,20	39,31	4,24	3,65	0,780
5	2	7,727	103,03	52,18	6,21	1,50	1,033
6	1	11,679	64,19	23,84	1,87	2,08	0,794
6	2	9,137	98,62	41,34	6,81	3,81	1,357
7	1	7,384	59,76	38,19	2,71	1,79	1,200
8	1	7,399	55,77	37,87	2,50	1,69	1,317
9	1	5,293	80,49	29,80	4,05	3,08	0,854
10	1	6,212	72,12	26,03	3,45	1,97	0,866

Tabelle 6: Zusammenfassung wichtiger Parameter für die Qualitätskontrolle der Transkriptomanalysen.

Aufgeführt sind die Nummer des Experiments, die Nummer des Replikats, der Faktor für die globale Skalierung, die Signalstärken für Hintergrund, Negativkontrollen (Neg.-Kontrolle), Rauschen sowie der durchschnittliche Ratio für Signale von 5'- und 3'-gelegenen *Probesets* bestimmter Gene (Ratio 5'/3') und dem Ratio aus Positivkontrolle und Haushaltsgenen (Ratio Pos.-Kontrolle/Hh.-Kontrolle). Die Kernexperimente sind grau hinterlegt. Extremwerte sind farbig markiert (blau: ideal, rot: kritisch). Der Skalierungsfaktor beschreibt indirekt die ursprüngliche Signalstärke. Verstärkungen bis 12fach sind üblich. Der Hintergrund ist der durchschnittliche Signalwert für den Bereich zwischen den *Probes*. Er hängt unter anderem von der Effizienz der Wasch- und Färbeschritte ab. Üblich sind Werte zwischen 50 und 75. Die Signalintensität der Negativkontrollen gibt an, welcher durchschnittliche Helligkeitswert für nicht hybridisierende *Probes* bestimmt wird. Werte < 50 sind üblich. Das Rauschen beschreibt die Streuung der Messwerte, Werte < 5 sind üblich. Alle Signalintensitäten beziehen sich auf eine theoretisch bis zu 6×10^4 Hilfseinheiten große Skala. Das 5'/3'-Verhältnis ist ein Maß für die Güte der eingesetzten RNA. Optimal wäre ein Verhältnis von 1, realistisch werden meist 1,5 bis 4 erreicht. Das Verhältnis aus den Intensitäten von abundanten Hybridisierungskontrollen (Pos.-Kontrolle) und Haushaltsgenen (Hh.-Kontrolle) beschreibt die Effizienz der cRNA-Synthese. Angestrebt sind Werte < 1, realistisch wird im Regelfall bis < 1,5 erreicht.

Es zeigt sich, dass je ein Replikat der frühen und der späten BNL-Überexpression (Experimente 2 und 5) suboptimale Werte in der Qualitätskontrolle aufweisen. Die genaue Betrachtung exemplarischer Expressionswerte zeigt aber (Daten nicht gezeigt), dass diese *Chips* durchaus auswertbar sind, auch wenn in Einzelfällen bestimmte Expressionswerte nicht berücksichtigt wurden.

2.2.2 Verschiedene statistische Verfahren identifizieren differentiell repräsentierte Gene im Vergleich von Experimenten

Es wurden direkte Vergleiche zwischen den Transkriptomen vorgenommen. Dazu wurden die Rohdaten mit zwei verschiedenen Verfahren analysiert. Zum einen wurde die in MASv5 implementierte und auf dem Rangstufentest von Wilcoxon basierende statistische Beurteilung („no change“ oder „increase“ oder „decrease“) betrachtet. Zum anderen wurde das durch den Ausschluss extremer *Probe*-Einzelwerte gegenüber statistischen Schwankungen robustere Verfahren nach Naef (VnN, Naef et al., 2002) angewandt, dass eine mögliche differentielle Expression ebenfalls in einem p-Wert aus dem Rangstufentest von Wilcoxon ausdrückt. Eine Auftragung der

Expressionswerte aus beiden Verfahren gegeneinander zeigte eine weitgehende lineare Korrelation (durchgeführt für die Replikate der Kontrollgruppe *w*; *bil*-GAL4, $r \sim 0,90$, Daten nicht gezeigt), mit Ausnahme derjenigen *Probesets*, für deren *Probe*-Einzelwerte nach dem VnN Extrema detektiert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen worden waren.

MicroArray Suite v5-Analyse. Zum Vergleich der Transkriptome wurden die Replikate aus der Kontrollkreuzung gegen die Replikate der anderen Genotypen verglichen. Aus diesen Kreuzkorrelationen wurden diejenigen *Probesets* als wahrscheinlich von BNL abhängig ausgewählt, die in allen vier Kombinationen nach Einschätzung von MASv5 statistisch signifikant differentiell repräsentiert sind. Beispielsweise wäre dies der Fall, wenn Beurteilung Kontrollreplikat 1 gegen Testreplikat 1: „*Increase*“, Kontrollreplikat 2 gegen Testreplikat 1: „*Increase*“, Kontrollreplikat 1: gegen Testreplikat 2 „*Increase*“ und Kontrollreplikat 2 gegen Testreplikat 2: „*Increase*“ lautet. Für den Fall, dass nur ein Testreplikat vorhanden war, wurden unter Inkaufnahme der daraus resultierenden Fehleranfälligkeit die dafür noch verbleibenden Vergleichsmöglichkeiten betrachtet. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Balken- und Mengendiagrammen für die Experimente mit der Überexpressions- und Mutantensituation von *bnl* (siehe **Abbildung 16**) als auch für die Experimente mit dem Transkriptionsfaktor SIMA und Embryonen unter hypoxischen Bedingungen (siehe **Abbildung 17**) zusammengefasst. Biologisch interessante *Probeset*-Mengen aus den Venn-Diagrammen sind mit Buchstaben versehen und im Tabellenwerk zusammengefasst.

Verfahren nach Naef. Die p-Werte nach Naef wurden ebenfalls in einer Kreuzkorrelation miteinander verglichen. Als statistisch signifikant differentiell repräsentiert wurden diejenigen *Probesets* gewertet, die bei abnehmender Stringenz im Einzelvergleich höchstens $p < 10^{-3}$, bei zwei Vergleichsmöglichkeiten ein $p^2 < 10^{-5}$ und bei vier Vergleichsmöglichkeiten ein $p^4 < 10^{-10}$ erreichten. Es wurden zusammenfassend Diagramme (siehe **Abbildung 18** und **Abbildung 19**) analog zur Analyse mit MASv5 erstellt.

Die Auswertung zeigt, dass das Berechnungsverfahren nach Naef für die BNL-Überexpression im Stadium 14 deutlich mehr differentiell repräsentierte *Probesets* identifiziert als MASv5. Dies könnte darin begründet sein, dass beide Testreplikate in diesem Stadium suboptimale Qualitätswerte aufweisen. Es besteht die Möglichkeit, dass hier einzelne *Probesets* von MASv5 nicht entsprechend verarbeitet werden können, wohl aber vom VnN. Im Stadium 17 werden weniger *Probesets* als Kandidaten erkannt. Im Vergleich beider Stadien erscheint die Anzahl differentiell repräsentierter *Probesets* homogener. Auch die Anzahl möglicher Kandidaten aus der Transkriptomanalyse der Mutantenlinie ist mit dem VnN geringer als mit MASv5.

Es wäre zu erwarten, dass von BNL kritisch abhängige Faktoren in der Überexpressionssituation überrepräsentiert und in der Funktionsverlustsituation unterrepräsentiert sind (oder umgekehrt), also

eine inverse Korrelation besteht. Auch eine ähnliche Repräsentation in beiden Altersstadien der Überexpressionssituation wäre guter Hinweis auf Abhängigkeit von BNL. Es zeigt sich bei Betrachtung der Venn-Diagramme (siehe **Abbildung 18**), dass das VnN mehr *Probesets* dieser Art erkennen lässt als MASv5. Dies kann als Hinweis verstanden werden, dass das VnN aufgrund seiner Robustheit gegenüber statistischen Schwankungen tatsächliche biologische Phänomene zuverlässiger erkennen lässt als MASv5, das auf statistische Schwankungen empfindlicher reagiert.

Tatsächlich erkennen beide Verfahren unterschiedliche *Probesets* als solche Kandidaten. Durch MASv5 fallen in den Mengen a, d, f, h (siehe **Abbildung 16**) neben unannotierten Genen besonders solche für Proteine mit putativer antimikrobieller Funktion (IM2, CG15065) und zwei Endopeptidasen (CG4998, CG2229) auf, die durch BNL aktivierbar sind und in der Mutantensituation weniger stark repräsentiert sind. Mit dem VnN werden in den Mengen a-d (siehe **Abbildung 18**) ungleich mehr Gene erkannt. Es handelt sich neben einer Vielzahl unannotierter Gene um solche mit Funktionen in der angeborenen Immunantwort (IM3, CG15065, *LysE*), Gene für eine Endopeptidase (CG17571), verschiedene Endopeptidase-Inhibitoren (CG3604, CG16713), drei verschiedene Proteinkinasen (CYCB3, CYCA, CG8878), verschiedene Enzyme (CG9468, CG12428, CG6188) sowie an Aktin (CNO) und Tubulin (MAP60) bindende Proteine. Der Überlapp zwischen beiden Verfahren ist gering und beschränkt sich auf die Gene mit Immunfunktion.

Des weiteren wurde die Überexpression des Transkriptionsfaktors SIMA in den Stadien 14 und 17 sowie die Effekte von Hypoxie auf den entwickelnden Embryo analysiert. Zunächst zeigt sich, dass das VnN (siehe **Abbildung 19**) deutlich weniger *Probesets* als Kandidaten identifizierte als MASv5 (siehe **Abbildung 17**). Dies lässt sich wahrscheinlich damit begründen, dass für die Überexpressionssituation von SIMA im Stadium 14 nur ein Datensatz zur Verfügung stand, und aufgrund einer Verwechslung das Material für das Hypoxie-Experiment (Ore R als Kontrolle in Normoxie, Ore R für 6 h unter 5% O₂ als Test) im Vergleich zu den anderen Experimenten eine Stunde zu früh fixiert wurde und daher nur untereinander vergleichbar ist. Betrachtet man ausschließlich die Daten, die mit dem VnN ermittelt wurden, so sind im Gegensatz zu den BNL-Experimenten im Zusammenhang mit SIMA und Hypoxie deutlich weniger Gene differentiell repräsentiert. Als besonders interessant erschienen die *Probesets*, die im späten Embryo unter der Überexpression von SIMA, BNL und durch Hypoxie aktiviert werden (Menge a in **Abbildung 17**, Mengen a und b in **Abbildung 19**), da ein Modell der transkriptionellen Aktivierung von *bnl* durch SIMA in geringen Sauerstoffkonzentrationen postuliert wird (Ghabrial et al., 2003). Mit MASv5 kann man so 14 Kandidaten erkennen, die allerdings aufgrund der Datenlage im Hypoxie-Experiment nur wenig robust erscheinen. Es handelt sich um 12 Gene für Proteine unbekannter Funktion sowie ein Protein der Immunantwort (DRO5) und die Endopeptidase CG4998, die in der Mutantensituation nicht aktiviert werden. Die zwei Kandidaten aus dem VnN haben Funktionen in der Immunantwort (DRO5) und als Zytoskelettkomponente (CNO).

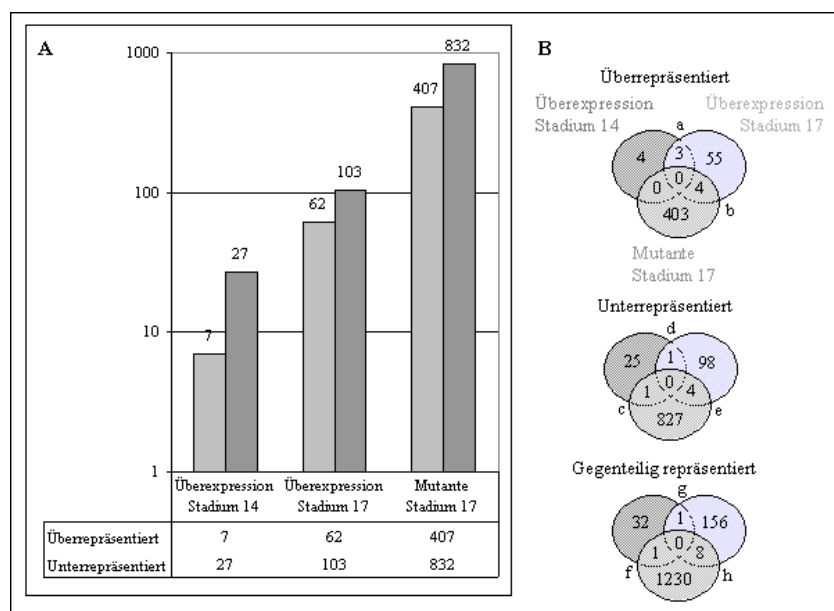


Abbildung 16: Grafische Darstellungen zur Transkriptomanalyse nach Missexpression von BNL, Auswertung mit MASv5. (A) Häufigkeitsdiagramm. Verglichen werden die Überexpression im Stadium 14 und Stadium 17 sowie der Funktionsverlust (Mutante) im Stadium 17. Dargestellt ist die Anzahl der Transkripte, die in der jeweiligen Situation im Vergleich zu Embryonen der Kontrollkreuzung über- oder unterrepräsentiert sind. Man beachte, dass das Diagramm in logarithmischer Darstellung angezeigt wird. **(B) Venn-Diagramme.** Aus den Venn-Diagrammen kann ersehen werden, ob bestimmte *Probesets* unter verschiedenen Bedingungen über- oder unterrepräsentiert werden. So zeigt sich beispielsweise im oberen Diagramm, dass 3 *Probesets* sowohl in der Überexpression im Stadium 14 als auch im Stadium 17 überrepräsentiert sind (Menge a), und dass 4 *Probesets* in der Überexpression im Stadium 17 ebenso überrepräsentiert sind wie in der Mutanten (Menge b). Interessant ist vor allem im Diagramm unten die Veranschaulichung der gegenteilig repräsentierten *Probesets* zwischen den Überexpressionssituationen beider Stadien mit der Mutantensituation (Mengen f und h), da die Transkriptstärke offensichtlich stark mit der Aktivität von BNL korreliert. Die Identität der mit Buchstaben versehenen Kandidaten kann dem Tabellenwerk entnommen werden.

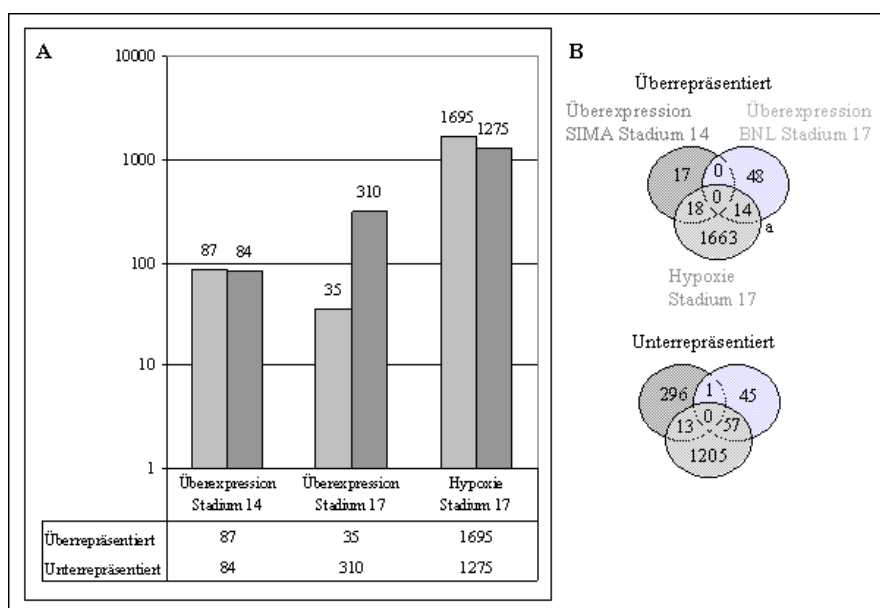


Abbildung 17: Grafische Darstellungen zur Transkriptomanalyse nach Missexpression von SIMA und von unter Hypoxie entwickelten Embryonen, Auswertung mit MASv5. (A) Häufigkeitsdiagramm. Analog zur vorangegangenen Abbildung werden die Überexpression im Stadium 14 und Stadium 17 sowie die Hypoxiesituation im Stadium 17 verglichen. **(B) Venn-Diagramme.** Venn-Diagramme zur Korepräsentation bei Überexpression von SIMA, BNL und unter Hypoxie im Stadium 17. Die in der Literatur diskutierte

Abhängigkeit von SIMA, BNL und Hypoxie kann mit den vorliegenden Daten nicht nachvollzogen werden. Danach würde man einen deutlichen Überlapp zwischen den drei Bedingungen, und im Hinblick auf die hypoxische Aktivierung von BNL einen größeren Überlapp zwischen dem BNL- und dem Hypoxie-Experiment erwarten.

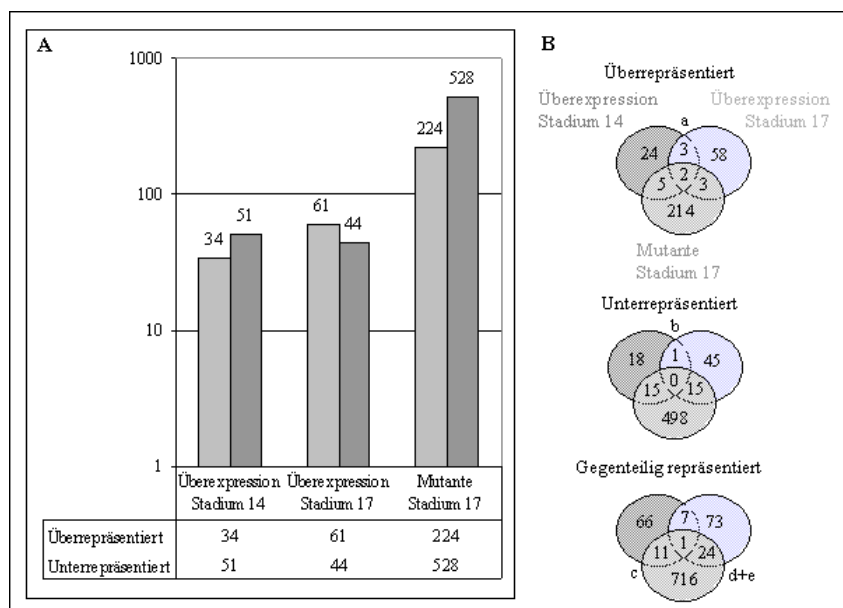


Abbildung 18: Grafische Darstellungen zur Transkriptomanalyse nach Missexpression von BNL, Auswertung mit dem VnN. (A) Häufigkeitsdiagramm. Verglichen werden die Überexpressionssituation im Stadium 14 und Stadium 17 sowie die Funktionsverlustsituation (Mutante) im Stadium 17. Die Darstellung erfolgt analog zur Darstellung der Daten aus MASv5. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit dem VnN weniger *Probesets* als Kandidaten identifiziert werden als mit MASv5, was an der stringenteren statistischen Filterung der Rohdaten liegen könnte. **(B). Venn-Diagramme.** Obgleich insgesamt weniger *Probesets* als differenziell repräsentiert identifiziert werden, ist der Überlapp besonders bei den kritisch von BNL abhängigen Faktoren deutlich größer als mit dem Verfahren von MASv5. Dies kann als Indiz für die Verlässlichkeit des VnN gewertet werden.

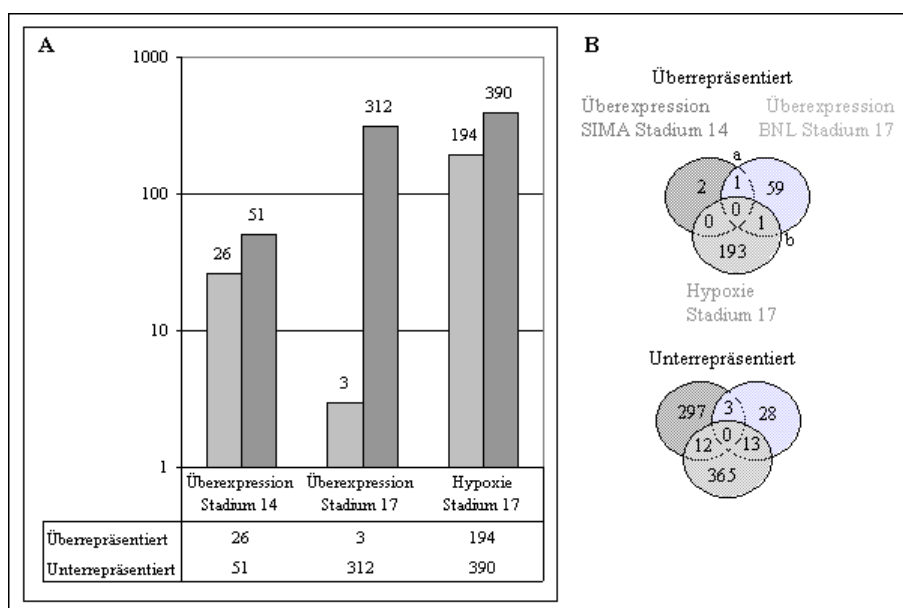


Abbildung 19: Grafische Darstellungen zur Transkriptomanalyse nach Missexpression von SIMA sowie von unter Hypoxie entwickelten Embryonen, Auswertung mit dem VnN. (A) Häufigkeitsdiagramm. Verglichen werden die Überexpressionssituation im Stadium 14 und Stadium 17 sowie das Hypoxie-Experiment im Stadium 17. Durch die fehlende Verfügbarkeit von Replikaten werden *Probesets* mit statistisch unsicheren Werten nicht als Kandidaten identifiziert. Es werden demnach deutlich weniger

Probesets als von SIMA oder Hypoxie abhängig gezeigt als mit MASv5. **(B) Venn-Diagramme.** Venn-Diagramme zur Korepräsentation bei Überexpression von SIMA, BNL und unter Hypoxie im Stadium 17. Auch hier kann die in der Literatur diskutierte Abhängigkeit von SIMA, BNL und Hypoxie wie bei der Analyse mit MASv5 nicht nachvollzogen werden.

Varianzanalyse und Signifikanzanalyse. Der direkte m:n-Vergleich von Experimenten gehört zu den Trivialansätzen in der Transkriptomanalyse. Weitergehende Verfahren sind die Varianzanalyse (englisch: *analysis of variance*, ANOVA) und die Signifikanzanalyse für *Microarrays* (englisch: *significance analysis of microarrays*, SAM). Mit ihnen kann man in Gruppen von Transkriptomen ($n > 2$) genau solche *Probesets* identifizieren, die in einer Gruppe statistisch signifikant anders repräsentiert sind als in den anderen Transkriptomen. Die ANOVA ist eine Erweiterung der t-Test-Statistik auf mehr als zwei Gruppen. Auch hier gilt, je mehr Replikate zur Verfügung stehen, desto zuverlässiger wird das Verfahren. Es wird eine Kreuzkorrelation zwischen den verschiedenen Replikaten durchgeführt, wobei die ANOVA nur einen gemeinsamen p-Wert pro *Probeset* berechnet, der nichts mit dem multiplizierten p-Wert aus der Trivialanalyse gemein hat. Die SAM wiederum gehört zu den sogenannten *Bootstrap*-Verfahren, die aus der Datengrundlage über Zufallsmethoden eine Normalverteilung generieren. Sie wird für jedes *Probeset* verglichen, was gegenüber statistischen Schwankungen zwischen Replikaten robuster ist. Ein Vorteil der SAM ist, dass basierend auf der Datengrundlage mit der Anzahl der identifizierten differentiell repräsentierten Kandidaten zugleich ein Schätzwert abgegeben wird, wie viele falsch-positive sich darunter befinden.

Beide Analysen wurden sowohl für die Daten aus MASv5 als auch aus dem VnN durchgeführt, wobei das Hypoxie-Experiment aufgrund fehlender Replikate ausgeklammert wurde. Auf dem Signifikanzniveau von $p < 10^{-3}$ für die ANOVA wurden aus den Daten der Auswertung mit MASv5 1645 *Probesets* und aus dem VnN 407 *Probesets* als differentiell repräsentiert identifiziert. Sie wurden dann der Komponentenanalyse und verschiedenen Gruppierungsverfahren zugeführt. Die SAM wurde über die Variation des Parameters Δ so angepasst, dass für beide Berechnungsgrundlagen die 50 am signifikantesten differentiell repräsentierten *Probesets* berücksichtigt wurden (beide: *10-Nearest Neighbor Imputer*, Antwort mehrerer Klassen, Permutationen: 100, Startwert für Zufallsgenerator: 1234567; $\Delta_{\text{MASv5}} = 0,32804$, $\Delta_{\text{VnF}} = 0,33933$). Damit ergab sich die Anzahl putativ falsch positiver *Probesets* für MASv5 = 0,60 und VnF = 0,63, also rund 1% der Kandidaten.

Die 50 Kandidaten aus der SAM sind dem Tabellenwerk zu entnehmen. Obgleich alle Missexpressionssituationen zusammen durch SAM analysiert wurden, handelt es sich bei allen Kandidaten um solche, die nach Überexpression von BNL signifikante Veränderungen im Vergleich mit der Wildtypsituation aufweisen. Sie wurden mit der Datenbank *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* DAVID (Dennis et al., 2003) für beide Verfahren auf ihre Verteilung innerhalb der GO-Datenbank hin überprüft. Es zeigt sich, dass neben den unannotierten Genen wie auch in den vorangegangenen Analysen hauptsächlich *Probesets* von Genen differentiell repräsentiert sind, die eine Funktion in der Immunabwehr haben, sowie für die Proteinkinasen CYCA

und CYCB. Auf beiden Listen stimmen 18 Nennungen überein, wobei für 9 *Probesets* eine Annotation vorhanden ist. Bei den entsprechenden Proteinen sind drei mit Funktionen in der angeborenen Immunität (IM1, IM2, DRS), drei mit Funktionen in Zellzyklus und Translationskontrolle (PIM, SMG, MCM7), zwei als chitinbindende Proteine (CG17052, GASP) und eins als antioxidatives Protein (PRX2540-2) annotiert.

Komponentenanalyse und Gruppierungsverfahren. Die 1645 (MASv5) und 407 (VnN) differentiell repräsentierten *Probesets* wurden einer Komponentenanalyse unterzogen (siehe **Abbildung 20** und **Abbildung 21**). Mit ihr kann aus dem mehrdimensionalen Datensatz in einer dreidimensionalen Projektion bestimmt werden, welche Missexpressionssituationen zueinander ähnlich sind. Während es auf der Datengrundlage von MASv5 so erscheint, als bildete die Mutantensituation eine Klasse und die Überexpressionen von BNL und SIMA je eine stadienabhängige Klasse, kommt es auf Berechnungsgrundlage des VnN zu einer deutlichen Fünfteilung: In ihr bilden die Mutantensituation und die Überexpression von BNL im Stadium 17 jeweils weit entfernte separate Klassen, die Überexpression von BNL im Stadium 14 stellt eine eigene Klasse dar, und die beiden Überexpressionssituationen von SIMA definieren eine gemeinsame Klasse.

Die Daten wurden weiterhin verschiedenen Gruppierungsverfahren unterzogen (siehe **Abbildung 20** und **Abbildung 21**). Zur Übersicht diene die hierarchische Gruppierung nach der durchschnittlichen Euklid'schen Distanz der Korrelationskoeffizienten. Die *k-Means*-Gruppierung mit 16 Gruppen wurde zur Selektion genau derjenigen *Probesets* angewandt, die in den Überexpressionssituationen von BNL überrepräsentiert und in der Mutantensituation unterrepräsentiert erscheinen. Auf diese Weise wurden für die Daten aus MASv5 die *Probesets* aus den Gruppen 4 und 9 mit insgesamt 329 Kandidaten und für die Daten aus dem VnN die Gruppen 6, 9, 12, 14 und 15 mit insgesamt 193 Kandidaten selektiert. Die Identität dieser Kandidaten ist dem Tabellenwerk zu entnehmen. Der Überlapp zwischen MASv5 und dem VnN bilden 65 *Probesets*. Davon werden drei Kandidaten (für Proteine MCM7, SMG, CG5175) auch mit der SAM gefunden.

Die Annotierungen für die 65 gemeinsamen *Probesets* sind hochdivers. Es erfolgt daher eine gemeinsame Beurteilung mit den anderen 329 (MASv5) und 193 (VnN) Kandidaten aus den ausgewählten Gruppen (siehe **Abbildung 22**). Für die meisten *Probesets* ist keine funktionelle Annotation verfügbar (208 Nennungen für MASv5, 91 Nennungen für das VnN). Für die anderen Kandidaten fällt deutlich auf, dass für beide Berechnungsgrundlagen dieselben biologischen Prozesse identifiziert werden, auch wenn die Häufigkeit der Nennung in DAVID leicht variiert. Es sei erwähnt, dass einzelne *Probesets* auch mehrfach annotiert sein können, sodass die angegebenen Nenngrößen nicht als tatsächliche Anzahl an *Probesets* mit dieser Funktion verstehen lassen. Einige Kandidaten sollen hier exemplarisch erwähnt werden. Am häufigsten werden „physiologische Prozesse“ (96

Nennungen für MASv5, 42 Nennungen für das VnN) genannt, was auf die starke Repräsentation von antimikrobiellen Peptiden, Lysozymen und anderen immunrelevanten Faktoren zurückzuführen ist. Mit 86 (MASv5) und 42 (VnN) Nennungen zeigt die Annotierung „katalytische Aktivität“ die Vielzahl von Enzyme (hier auch: Endopeptidasen und antioxidativ wirkende Proteine), die identifiziert werden können. Die drittgrößte Gruppe stellen „zelluläre Prozesse“ mit 53 (MASv5) und 24 (VnN) Nennungen. Es sind vor allem Proteinkinasen (speziell die Cyc- und Cdc-Subtypen) und zellzyklusregulierende Proteine wie WEE, FZY und AGO und andere mitotisch relevante Proteine, die zur Stärke dieser funktionellen Gruppe beitragen. Am Zellgeschehen ebenfalls stark beteiligt sind GTPasen sowie ihre Modulatoren, auch Chromatin modifizierende Enzyme werden gefunden. Als mRNA-bindende Translationshemmer findet man BCD und SMG. Eine weitere große Gruppe sind Proteine mit Transporterfunktion (23 Nennungen für MASv5, 12 Nennungen für das VnN), hier sind sowohl Transportine mit Kerntransporterfunktion als auch aktive Iontentransporter zusammengefasst. Auch *Probesets* für Gene mit Funktionen in der Signaltransduktion werden gefunden, so z.B. ein Homolog zum transformierenden Wachstumsfaktor (ALP23B), das in der WINGLESS-Signalkaskade wichtige AXN, das für die NOTCH-Signalkaskade wichtige CNO, der Transmembranrezeptor TL, ein putatives SH2/SH3-Adaptermolekül (CG31163) sowie das Peptidoglykan erkennende PGRP-LE. Besonders interessant erscheinen *Probesets* von Transkriptionsfaktoren, da sie möglicherweise die Vermittler der FGF-Funktion darstellen. Neben BCD, MED21, GRO, TAN und LOLA treten hier vor allem STAT92E und TDF in den Vordergrund, da für sie bereits eine Funktion in der Tracheogenese beschrieben wurde. Viele Kandidaten (37 Nennungen für MASv5, 13 Nennungen für das VnN) verfügen über eine Annotation im Bereich der Entwicklungsprozesse. Für die entsprechenden Proteine werden hier Funktionen hauptsächlich in der Neurogenese (LOLA, PTP61F, MFAS und GISH) und der Modifikation des Zytoskeletts (KEL, GISH, DAH, MAEL und PKA-R1) genannt. Auch die Entwicklung der Immunantwort (TL, SCRIB und THOR) sowie Faktoren der geschlechtsspezifischen Dosiskompensation (MOF und MSL-3) und Gametenbildung (RETN und TWE) sind aufgeführt. Für den Prozess der trachealen Morphogenese wird der Rezeptor des transformierenden Wachstumsfaktor, TKV, identifiziert.

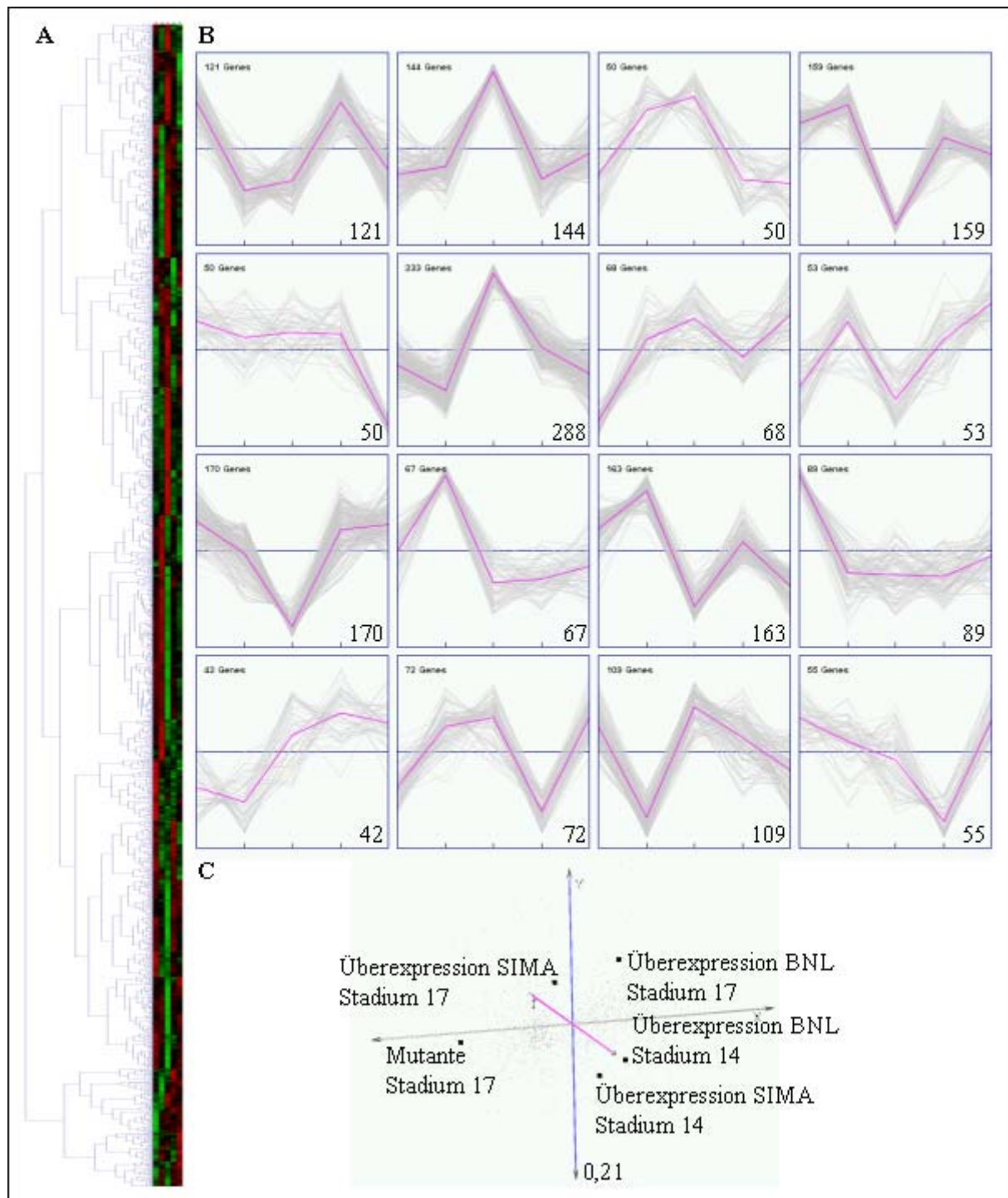


Abbildung 20: Gruppierungsverfahren (A und B) und Komponentenanalyse (C) für 1645 durch ANOVA ($p = 0,001$) ausgewählte Probesets aus MASv5. (A) Hierarchische Gruppierung. Von links nach rechts: Überexpression von BNL im Stadium 14, Überexpression von BNL im Stadium 17, Funktionsverlustmutante, Überexpression von SIMA im Stadium 14, Überexpression von SIMA im Stadium 17. Die nach Euklid'scher Distanz sortierten normalisierten Genvektoren wurden nach dem Verfahren der durchschnittlichen Distanz gruppiert. Man erkennt beim Einzelwert innerhalb eines Vektors durchschnittliche Repräsentation des Probesets im Vergleich zur Repräsentation unter den anderen Bedingungen als schwarz, entsprechende Unterrepräsentation sind grün und Überrepräsentation sind rot gekennzeichnet. Im Mittelteil des Diagramms erkennt man deutlich die Gruppe der Probesets, die unter der Überexpression von BNL überrepräsentiert und in der Mutantensituation unterrepräsentiert sind. **(B) k-Means-Gruppierung (4x4).** Staffelung der Experimente wie zuvor. Das Verfahren detektiert die 16 häufigsten Profile (Gruppen 1-16, von links nach rechts) entlang der Genvektoren. Die Mittellinie stellt den durchschnittlichen Ratio dar, die hellgrauen Linien den Profilverlauf einzelner Probesets und die magentafarbene Linie deren Durchschnitt dar. Hier sind die Gruppen 4 und 9 von besonderer Bedeutung, da sie einen kritisch von BNL abhängigen Verlauf haben. **(C)**

Komponentenanalyse. Aus allen Genvektoren werden über komplexe Faltungsoperation die sogenannten Komponenten bestimmten, die sich als Datenpunkt in einem dreidimensionalen Koordinatensystem darstellen lassen. Mit diesem Verfahren kann ermittelt werden, dass hier die Experimente im Stadium 14 und die im Stadium 17 je eine eigene Gruppe bilden, und dass die Mutantensituation von beiden weit entfernt ist.

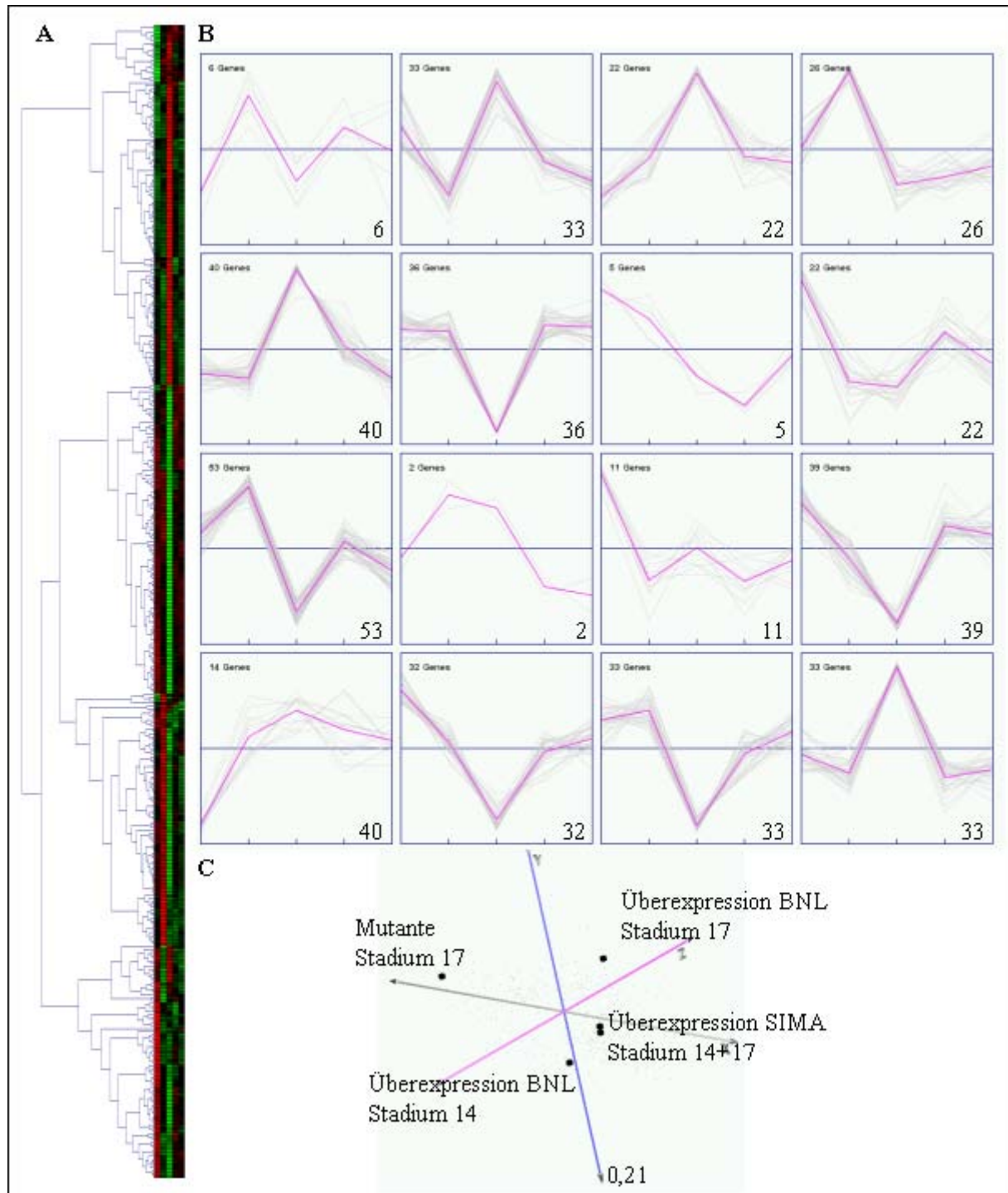


Abbildung 21: Gruppierungsverfahren (A und B) und Komponentenanalyse (C) für 407 durch ANOVA ($p = 0,001$) ausgewählte Probesets aus Daten des VnN. Die Darstellung ist analog zur Darstellung für MASv5. (A) **Hierarchische Gruppierung.** Durch die geringere Anzahl an Probesets können hier sogar einzelne Werte identifiziert werden. Es werden ähnliche Gruppen wie mit MASv5 identifiziert. (B) **k-Means-Gruppierung (4x4).** Kritisch von BNL abhängig erscheinen hier die Gruppen 6, 9, 12, 14 und 15. (C) **Komponentenanalyse.** Die Bestimmung durch das VnN zeigt, dass die Überexpression von SIMA in beiden Stadien relativ geringe Effekte hat und diese Experimente eine Gruppe bilden. Die Missexpressionen von BNL bilden jeweils eine eigene Einheit.

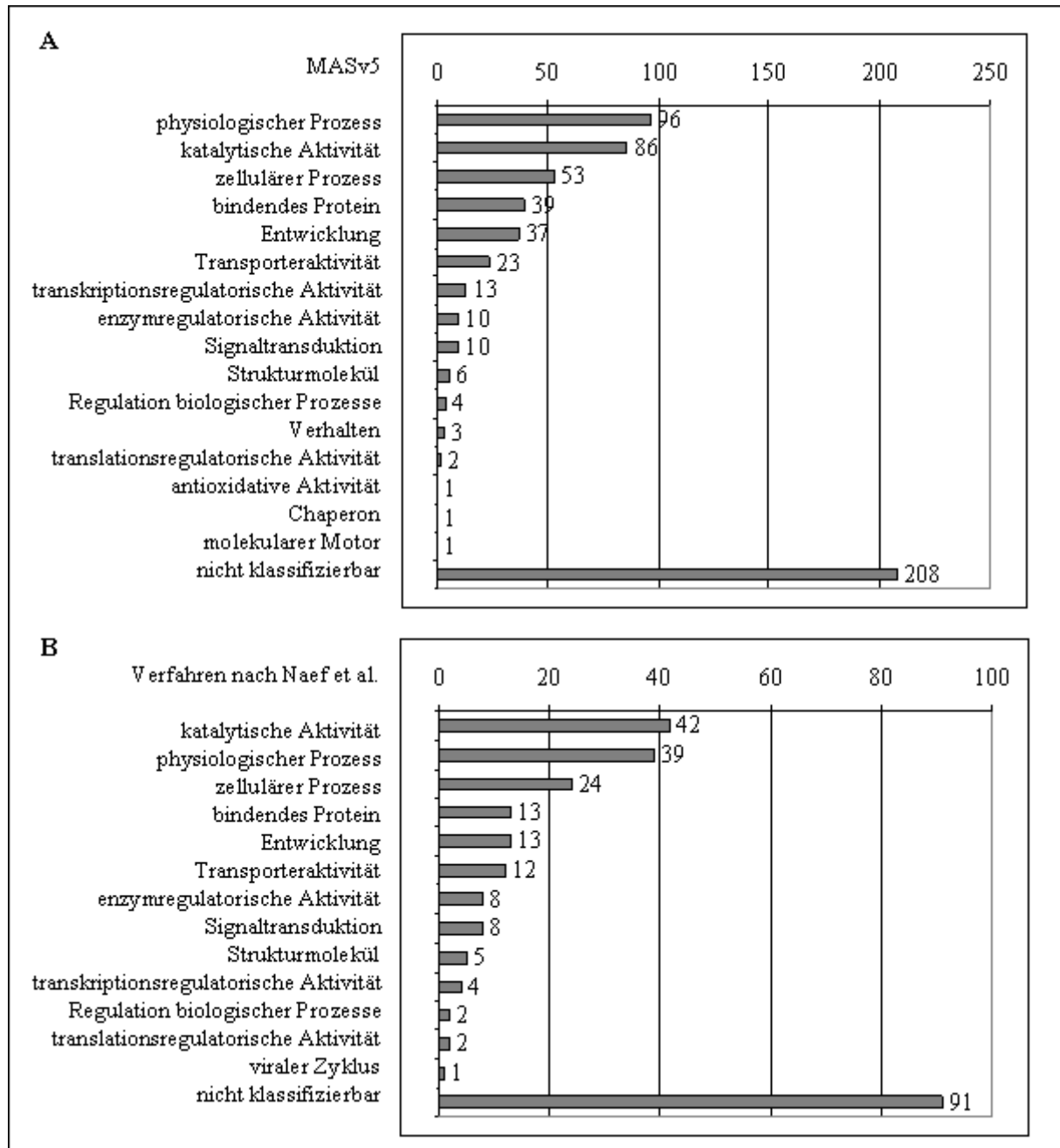


Abbildung 22: Funktionelle Einteilung der *Probesets* selektierter *k-Means*-Gruppen mit DAVID für die Daten aus (A) MASv5 und (B) dem VnN. Dargestellt sind die Annotierungen entsprechend der GO-Datenbank sowie die Häufigkeit ihrer Nennung für die übermittelten Kandidaten. Es muss beachtet werden, dass GO hochgradig redundant ist und die angegebenen Zahlenwerte nicht der Anzahl der *Probesets* entspricht. So kann ein entwicklungsrelevanter Transkriptionsfaktor hier unter zellulärer Prozess, Entwicklung und transkriptionsregulatorische Aktivität gezählt werden. Eine genaue Betrachtung der Kandidaten ist daher zwingend notwendig.

2.3 Bioinformatische Methodenentwicklung und Anwendung auf die Messdaten

Mit den bisher dargestellten Methoden kann keine Aussage über die biologische Relevanz der identifizierten Kandidaten getroffen werden. Neben überprüfenden *in situ*-Hybridisierungen zur Qualitätskontrolle im Hinblick auf die Zuverlässigkeit der ermittelten Expressionswerte wurde auch die biologische Plausibilität eruiert.

2.3.1 Überlegungen zur Identifikation trachealer Gene mittels statistischer Verfahren

Die genauere Betrachtung der in der Überexpression von BNL überrepräsentierten *Probesets* zeigt, dass unter den am stärksten regulierten Kandidaten solche Gene sind, die für Funktionen in der Geschlechtsdetermination (MST57DC für MASv5) und der angeborenen Immunität (IM2, IM1, IM10, IM4 und IM3 für das VnN) annotiert sind. Stellt man beispielsweise für die Überexpression von BNL im Stadium 17 den Ratio der logarithmischen Signalintensität von IM2 (MASv5: $4,5 \pm 0,58$; VnN: $5,23 \pm 0,60$) dem *Probeset* von DSRF (MASv5: $0,25 \pm 0,39$; VnN: $0,20 \pm 0,35$) gegenüber, so zeigt sich, dass die für die Tracheogenese bekannten Gene deutlich schwächer aktiviert werden. Dies ist verwunderlich, da sich die Anzahl der Terminalzellen in dieser Situation etwa verzehnfacht (zur Erinnerung: DSRF dient als molekularer Marker für diesen Zelltyp). Auch die Betrachtung der relativen Transkriptmenge des überexprimierten *btl* an sich im Stadium 17 (MASv5: $0,18 \pm 0,74$; VnN: $-0,38 \pm 0,78$) überrascht, denn *btl*-GAL4 ist eine der stärksten Treiberlinien und *in situ*-Hybridisierungen bestätigen (Daten nicht gezeigt), dass das Transkript deutlich mehr wird. Vergleicht man die Überexpressionssituation für dieses Gen im Stadium 14 (MASv5: $-0,73 \pm 0,51$; VnN: $1,63 \pm 1,32$) mit der Mutantensituation (MASv5: $-0,40 \pm 0,50$; VnN: $-2,31 \pm 1,02$), erscheint erneut das VnN als zuverlässiger. Dann sollte im Stadium 14 deutlich mehr Transkript durch die Überexpression vorhanden sein als in der Mutantensituation, und auch mehr als in der Überexpression im Stadium 17, da die Stärke der Treiberlinie zum Ende der Embryogenese hin abnimmt.

Betrachtet man die Ratio von bekannten Zielgenen der BNL-Signalkaskade oder anderen Tracheenmarkern wie TRH und DL (siehe **Tabelle 7**), so erkennt man, dass diese Werte im Regelfall deutlich < 1 sind. Die Streuweite der Ratio ist prozentual gesehen sehr groß. Es ist wie auch für andere Studien (Mariani et al., 2003) ersichtlich, dass man für die biologische Interpretation von einem festen Schwellenwert für den Ratio (etwa: Relevanz ab Ratio > 2) abweichen muss.

Wie ein Rechenbeispiel zeigt, sind die gemessenen Werte nicht dazu geeignet, tracheale Zielgene der BNL-Signalkaskade durch rein statistische Methoden zu identifizieren. Man nehme optimale Bedingungen bei der Gewinnung, Verarbeitung und Hybridisierung der Probe an. Ferner nehme man an, dass ein einzelnes Transkript einer hypothetischen Hilfseinheit bei der Analyse des Transkriptoms entspricht. Jede Terminalzelle enthalte genau ein Transkript komplementär zu einem bestimmten *Probeset*. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit setze man deren Anzahl $n_1 = 140$, die

Transkriptmenge wäre demnach 140 Hilfeinheiten, der üblicherweise von den Rechenverfahren zurückgegebene Wert wäre $\log_2 140 \sim 7,1$. Durch die Überexpression von BNL steigt die Anzahl der Terminalzellen bis zum Stadium 17 auf $n_2 = 1,4 \times 10^3$. Die Transkriptmenge steige analog, angegeben mit $\log_2 1,4 \times 10^3 \sim 10,5$. Mit $n_2/n_1 = 10:1$ für das tatsächliche Transkriptverhältnis ergibt sich also durch die Rechenverfahren der Ratio $10,5/7,1 = 1,48$. Dies steht im Gegensatz zu den Messwerten der Terminalzellgene *dsrf* und *dl*, denn MASv5 und das VnN ermitteln hier Werte, die deutlich niedriger liegen. Besonders kritisch ist die Tatsache, dass der Fehler teilweise in der Größenordnung der Messwerte liegt.

Tabelle 7: Bekannte Zielgene der BNL-Signalkaskade und ihre Repräsentation im Vergleich zum respektiven Wildtyp unter verschiedenen Bedingungen. Aufgeführt ist die Listenbezeichnung, das zugrunde liegende Rechenverfahren der Datenanalyse, das offizielle Gensymbol sowie die Ratio der logarithmierten Expressionswerte mit der Standardabweichung entsprechend der Kreuzkorrelationsmatrizen. Alle Ratio liegen deutlich unter dem Niveau derjenigen *Probesets*, die durch die statistischen Verfahren als Kandidaten detektiert werden.

Name	Verfahren	Symbol	Überexpression Stadium 14		Überexpression Stadium 17		Mutante Stadium 17	
			Ratio	+/-	Ratio	+/-	Ratio	+/-
CG4608	MASv5	<i>bnl</i>	-0,73	0,51	0,18	0,74	-0,40	0,50
CG4608	VnN		1,63	1,32	-0,38	0,78	-2,31	1,02
CG32134	MASv5	<i>btl</i>	1,63	0,36	0,45	0,56	0,43	0,59
CG32134	VnN		0,45	0,52	0,28	0,21	0,43	0,70
CG17077	MASv5	<i>pnt</i>	0,03	0,75	0,28	0,33	-0,75	1,00
CG17077	VnN		-0,33	0,58	-0,02	0,12	-0,24	0,09
CG3411	MASv5	<i>dsrf</i>	-0,10	0,08	0,25	0,39	0,43	0,22
CG4444	VnN ⁴		-0,09	0,85	0,20	0,35	0,02	0,18
CG3619	MASv5	<i>dl</i>	0,50	0,37	1,25	0,30	0,33	0,17
CG3619	VnN		0,44	0,49	0,88	0,48	0,29	0,31
CG6883	MASv5	<i>trh</i>	-1,50	0,66	-0,15	1,84	0,50	1,01
CG6883	VnN		0,21	0,38	0,04	0,09	0,26	0,24

Wendet man ein Filterverfahren an, das so parameterisiert ist, dass die Mess- und Fehlerwerte der *Probesets* für DSRF und DL die äußeren Intervallgrenzen darstellen und gerade noch als Kandidaten erkannt werden, so identifiziert man 751 (MASv5) oder 960 (VnN) *Probesets*, die potentiell für in Terminalzellen exprimierte Gene stehen – zu viele für eine Überprüfung der Expression im Tier. Verwendet man den Filter mit Parametern, die eine Identifikation anderer bekannter Gene der trachealen Morphogenese zulässt (entsprechende Daten im Tabellenwerk), so werden noch viel mehr *Probesets* zu Kandidaten. Die Grenzen zwischen statistischer Schwankung und Überrepräsentation durch tracheale Aktivierung sind also fließend.

Es wurden daher von mir verschiedene Verfahren entwickelt, die basierend auf zytologische und funktionelle Annotierungen eine Selektion putativ trachealer Gene ermöglichen sollten. Diese Methoden beruhen nicht nur auf statistischen Gesichtspunkten, sondern berücksichtigen funktionelle

⁴ CG3411 und CG4444 bezeichnen beide das Gen *dsrf*, es wird in den beiden Verfahren verschieden aufgelistet.

und zytologische Annotation. Angewandt wurden die computergestützten Verfahren ausschließlich auf die Daten aus dem VnN, da sie statistisch robuster sind als diejenigen aus MASv5.

2.3.2 GO-Cluster identifiziert differentiell repräsentierte Gene nach ihrer Annotation in der Gene Ontology-Datenbank

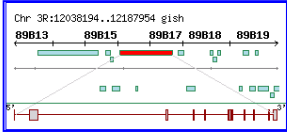
Ein Vorteil von *Drosophila* als Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie und die Bioinformatik ist die zentrale Verwaltung sämtlicher Sequenzdaten sowie genetischer und molekularer Annotation bei FlyBase (<http://www.flybase.org>, FlyBase Consortium, 2003). Diese Datenbank präsentiert für jedes Gen eine Zusammenfassung aller verfügbarer Informationen, wobei entsprechende Datenbankeinträge aus den verschiedenen Datenquellen direkt zugreifbar sind (siehe **Abbildung 23**).

Synopsis of Gene *gish*

Symbol <i>gish</i> other Synonyms	Full name <i>gilgamesh</i>	FlyBase ID FBgn0011253	HELP with Synopsis
		Date 27 Feb 04	Available reports
			Synopsis
			Abridged report
			Full report
			Recent updates
			Genome Annotation
			Subsections
			Alleles (9)
			Expression & Phenotypes (10)
			Map locations
			Constructs & Insertions (10)
			Genetic Interactions (13)
			Gene Ontology
			Stocks (2)
			References (25)
			Similar genes & Sequences (36)
			Synonyms (13)
			Attributed data (20)

GENOMIC ORGANIZATION

Chromosome arm 3R
 Cytogenetic map [89B9--12](#)
 Scaffold [AE003712](#)
 Recomb. map --



[Gene region map](#)

GENE PRODUCT
[Proteins & Transcripts](#)

Sequence: Format:

GENE ONTOLOGY

Molecular function [casein kinase I activity](#), [receptor signaling protein serine/threonine kinase activity](#)
 Biological process [intracellular signaling cascade](#)
 Cellular component --

Protein domains [Eukaryotic protein kinase](#), [Serine/Threonine protein kinase family active site](#), [Protein kinase-like \(PK-like\)](#), [Protein kinase-like \(PK-like\)](#), [details...](#)

External database links [Fly GRID](#) [Yale Dev. expression](#) [NCBI GEO](#)

SIMILAR GENES
 --

EXPRESSION & PHENOTYPES

Expressed in -- [details...](#)
 Mutants affect [eye](#), [lamina anlage glial cell](#), [lamina neuropil](#), [morphogenetic furrow](#), [ommatidium](#), [photoreceptor cell](#) and 4 others. [details...](#)

Summary

D. melanogaster gene *gilgamesh*, abbreviated as *gish*, is [reported here](#). It has also been known in FlyBase as CG6963, CKI-related and ms(3)89B. It encodes a product with [casein kinase I activity \(EC 2.7.1.-\)](#) involved in [protein amino acid phosphorylation](#). It has been [sequenced](#) and its [amino acid sequence](#) contains an [eukaryotic protein kinase](#) and a [serine/threonine protein kinase family active site](#). It has been mapped cytologically to [89B9--12](#). It interacts genetically with *ey*, *hh* and *so*. There are 9 recorded [alleles](#): 8 classical mutants (2 available from the public stock centers) and 1 wild-type. Mutations have been isolated which affect the *eye*, the *ommatidium*, the ectopic *lamina anlage glial cell* and 4 other listed tissues and are visible. *gish* is discussed in 24 [references](#) (excluding sequence accessions), dated between 1993 and 2003. These include at least 3 studies of mutant phenotypes, 2 studies of wild-type function and 5 molecular studies. Among findings on *gish* function, *gish* may be part of a repulsive signaling mechanism coordinating glial migration and neuronal development in the developing eye.

Abbildung 23: Beispielhafte Ansicht der Zusammenfassung aller verfügbarer Informationen zu einem Gen in FlyBase. Zu allen Informationen kann direkt auf die entsprechende Datengrundlage (Datenbanken für die Genomsequenz, Listen über verfügbare BAC- und EST-Klone sowie mutante Fliegenlinien, publizierte Ergebnisse etc.) zugegriffen werden.

Unter molekularer Annotation versteht man die Beurteilung eines Gens hinsichtlich der Funktion des Genprodukts, seiner Rolle im biologischen Kontext sowie seiner subzellulären Lokalisation. Die organisatorische Grundstruktur solcher molekularer Annotationen bezieht FlyBase aus der Hierarchie der *Gene Ontology*-Datenbank (Ashburner et al., 2000; GeneOntology Consortium, 2001). In ihr werden sowohl aufgrund von automatischen Sequenzvergleichen erstellte, als auch von Kuratoren aus Publikationen ersehene Annotationen in einem definierten Vokabular gespeichert. Der Zusammenhang

der Terme dieses Vokabulars bilden einen azyklischen Graphen, eine hierarchische Baumstruktur, der man an ihren Endpunkten entsprechende Genprodukte zuordnet. Ein einfaches fiktives Beispiel für die redundante funktionelle Annotation zweier Gene sei nachfolgend dargestellt. Tatsächlich sind mittlerweile etwa 2×10^4 Terme Bestandteil des GO-Vokabulars, das die Grundlage für die Annotation von fast 10^6 Genprodukten aus allen Organismen liefert.

molekulare Funktion	biologischer Prozess	Lokalisation
- Transkriptionsfaktor	- Metabolismus	- Kern
- Zelladhäsion	- Zellteilung	- Zellwand
- matrixbindend	- Organogenese	- <i>Gen1</i>
- <i>Gen1</i>	- Tracheogenese	- <i>Gen2</i>
- <i>Gen2</i>	- <i>Gen1</i>	- Zytosol
- nicht matrixbindend	- Neurogenese	
- Enzym	- <i>Gen2</i>	

Grenzen klassischer Gruppierungsverfahren. Oftmals versucht man im Rahmen der Analyse von Transkriptomdaten, durch Gruppierungsverfahren Koregulation zu erkennen und somit funktionell ähnliche Gene zu identifizieren. Innerhalb dieser Gruppen untersucht man die Kandidaten dann auf eine ähnliche Annotation, z.B. mit Hilfe von GO. Dies basiert auf der idealisierenden und oftmals falschen Annahme, dass zelluläre Regulation weitgehend auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Eine Regulation auf posttranskriptioneller und posttranslationeller Ebene wird hierbei nicht berücksichtigt. In der Realität kann es außerdem vorkommen, dass gerade die antagonistische Regulation zweier Gene die zelluläre Antwort auslöst. Mit klassischen Gruppierungsverfahren bleibt ein solcher Zusammenhang ebenfalls unberücksichtigt, da diese Gene unterschiedlichen Gruppen zugeteilt würden. Unterschiedliche numerische Gruppierungsverfahren klassifizieren die Daten nach jeweils eigenen Gesichtspunkten, die Anhäufung bestimmter GO-Terme (also von Annotationen bestimmter biologischer Prozesse) innerhalb von Gruppen ist daher auch vom Zufall bestimmt (Gibbons und Roth, 2002).

Das hierarchische Gruppierungsverfahren auf Grundlage von GO. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Verfahren entwickelt, das den hierarchische Aufbau von GO als Leitstruktur für die numerische Gruppierung von Expressionsdaten verwendet. Im Gegensatz zu den Ansätzen von MAPPFinder (Doniger et al., 2003) und GoMiner (Zeeberg et al., 2003) wird keine statistische Bewertung von einem bestimmten GO-Term zugeordneten Genen durchgeführt, sondern die manuelle Bewertung vorgezogen, wofür die Expressionsdaten durch das hierarchische Gruppierungsverfahren visuell für jeden gewünschten GO-Term aufbereitet werden. Dies hat den Vorteil, dass im Vorfeld keine mathematisch komplexen Filterregeln definiert werden müssen, quasi alle verfügbaren Datensätze informativ sind, und obgleich es sich um ein numerisches Gruppierungsverfahren handelt,

die Daten eher nach biologischer Relevanz denn nach statistischen Gesichtspunkten ausgewertet werden können.

Lokale Datenbankinfrastruktur und Programmentwicklung. Der Inhalt der GO-Datenbank ist monatlich aktualisiert von <http://www.godatabase.org/dev/database/archive/latest> für den Import in das MySQL-Datenbanksystem verfügbar. Die relationale Datenstruktur von GO mit ihren 22 Tabellen ist unter <http://www.godatabase.org/dev/sql/doc/go-uml.pdf> zusammengefasst. Der GO-geläufige eindeutige Bezeichner für die Gene von *Drosophila* ist der *FBid*-Wert (für: *FlyBase ID*). Über die Abbildung *FBid* > *CG-Nummer* aus einer lokalen Referenztabelle (generiert aus der Datei *cg_fbgn.txt* von FlyBase, Datenstand: 10. März 2004), verfügbar unter <http://www.flybase.org/genes/lk>, konnten GO-Terme direkt mit Sonden auf dem *Chip* assoziiert werden, wenn dieser nach dem VnN ausgewertet worden war. Für die Analyse von mit MASv5 generierten Daten wurden *Probesets* über die Referenztabelle mit einer *FBid* assoziiert. Die dafür notwendige Zuweisung von *Probeset* > *CG-Nummer* erfolgte durch Auswertung von *AffymetrixDrosGenome1Release3_genes.cdf* aus dem Verzeichnis <ftp://ftp.fruitfly.org/pub/download/Affymetrix>.

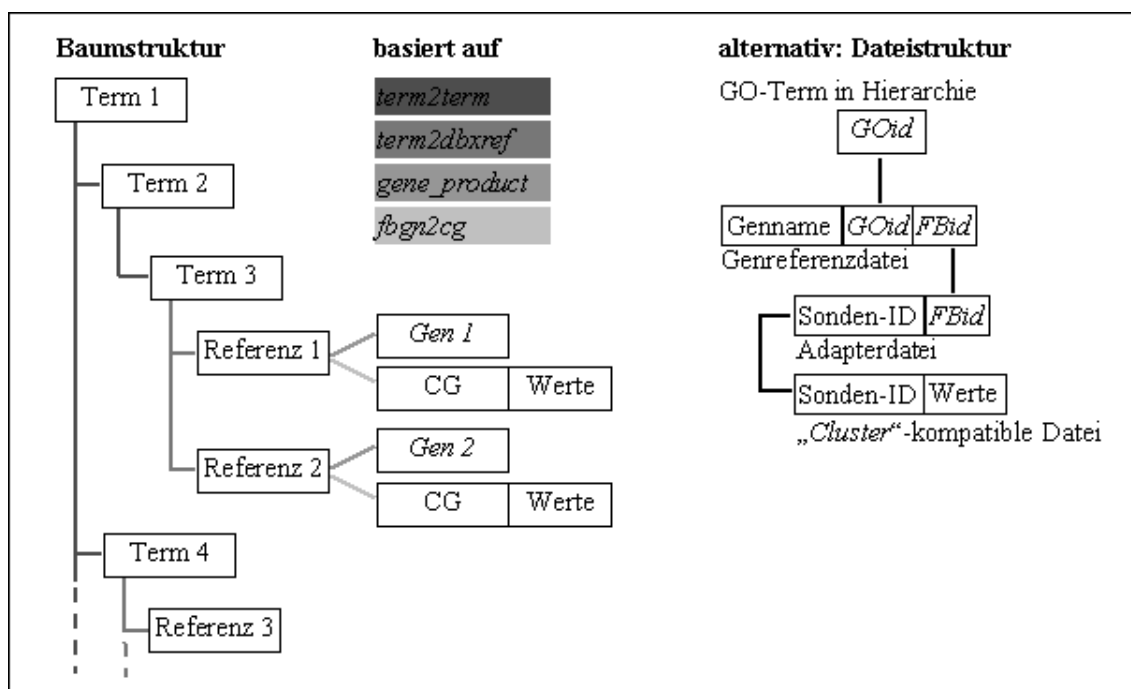


Abbildung 24: Die Datenverknüpfung innerhalb der Anwendung GO-Cluster. Die Baumstruktur kann über Tabellen des MySQL-Datenbanksystems erstellt werden (Tabellen und Verknüpfungen in Grautönen unterlegt). Um die Applikation auch für andere Modellsysteme nutzen zu können, können alternativ beliebige Genreferenzdateien eingeladen werden. Diese verknüpfen die interne Verwaltungsnummer (*GOid*) mit einem Gen, das über den Trivialnamen (*Genname*) und einer eindeutigen Verwaltungsnummer (hier: *FBid*, alternativ beispielsweise *GenBank*- oder *LocusLink*) aufgelistet wird. Eine Adapterdatei erlaubt zusätzliche Flexibilität, um beispielsweise für verschiedene Plattformen der Transkriptomanalyse nutzbar zu sein.

Es wurde ein Programm (GO-Cluster) von mir entwickelt, das aus der lokalen MySQL-Datenbank unter Zuhilfenahme der Tabellen *term*, *term2term*, *term_dbxref*, *dbxref* und *gene_product* die

hierarchische Struktur der GO-Datenbank generiert und in einer Baumstruktur darstellt. Dafür verwaltet *term2term* die Verknüpfungspunkte zwischen den Begriffen in *term*, und *term_dbxref* verweist auf den entsprechenden Datenbankeintrag für FlyBase aus *dbxref*. Für jeden Term werden dann die zugehörigen *FBid*-Werte ausgelesen, über *gene_product* die Gennamen ermittelt und überprüft, ob für diese Gene ein *Probeset* assoziiert ist (siehe **Abbildung 24**). Ist dies der Fall, werden die Expressionswerte aus einer Datei im „Cluster“-Format zugeladen, das ein Standardformat in der Analyse von Genexpressionsdaten ist.

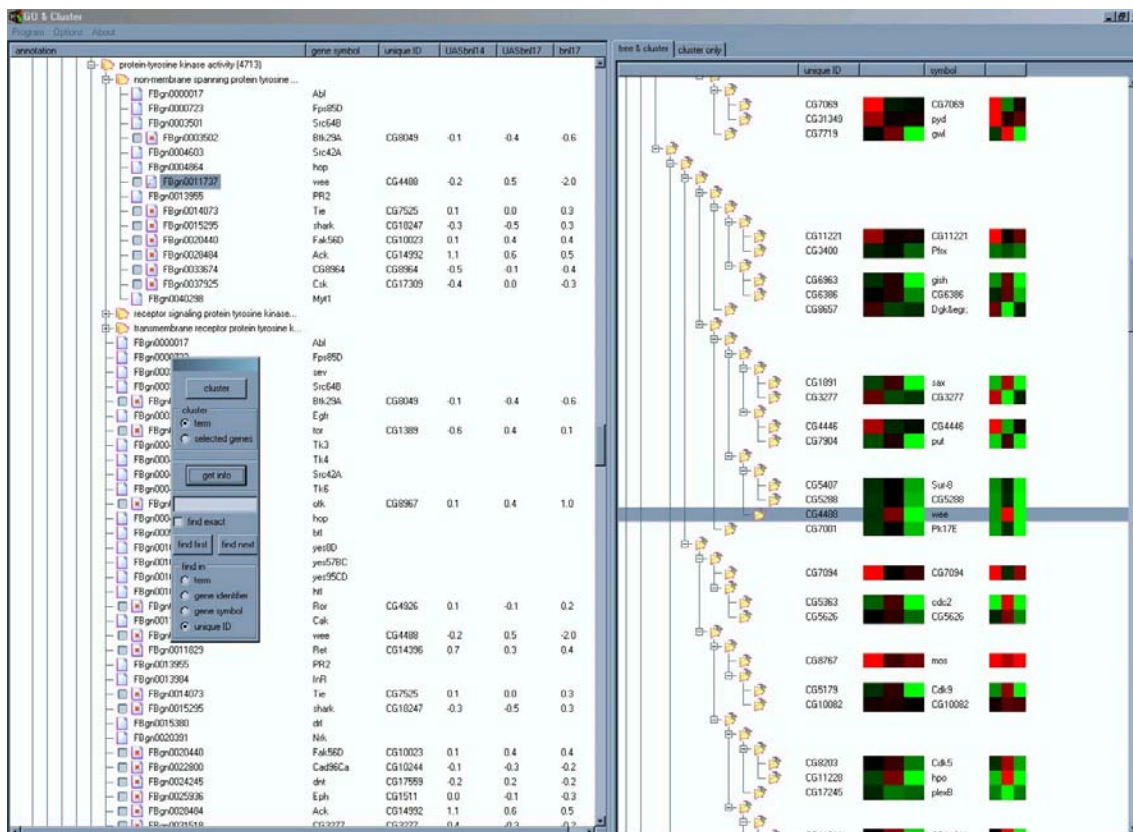


Abbildung 25: Beispielhafte Ansicht der GO-Cluster Programmoberfläche. Auf der linken Seite erkennt man Teile der GO-Hierarchie sowie zugeordnete Gene mit ihrer eindeutigen Katalognummer (*FBid*), dem Trivialnamen, der Sondenbezeichnung und den Expressionswerten. Auf der rechten Seite ist das Gruppierungsergebnis für den momentan aktiven GO-Term zu sehen. Im gezeigten Beispiel man erkennt an der Häufung der grünen Quadrate in der jeweils rechten Spalte, dass die hier sichtbaren, dem GO-Term zugeordneten Gene unter dieser experimentellen Bedingung (hier: *bml*^{P1} Mutantensituation) deutlich herunterreguliert sind. Die Applikation ist ebenso wie Interpretationshilfen zu den Gruppierungsergebnissen frei unter <http://www.mpibpc.mpg.de/go-cluster> für die akademische Gemeinschaft verfügbar.

Auf jeder Ebene der GO-Hierarchie kann nun das Gruppierungsverfahren angewandt werden. Eine beispielhafte Ansicht der Programmoberfläche ist in **Abbildung 25** wiedergegeben. Die Entscheidung fiel hier auf eine hierarchische Gruppierung nach dem Verfahren der durchschnittlichen Distanz. Das Verfahren kann einfach implementiert werden und reicht für eine grobe Gruppierung der Daten aus. Als Distanzmaß diente die Euklid'sche Distanz der normalisierten Genvektoren. Der hierfür berechnete Pearson'sche Korrelationskoeffizient ist für zwei Zahlengruppen $X = \{X_1, X_2, \dots, X_N\}$ und

$Y = \{Y_1, Y_2, \dots, Y_N\}$ als $r = \frac{1}{N} \sum_{i=1, N} \left(\frac{X_i - \bar{X}}{\sigma_X} \right) \left(\frac{Y_i - \bar{Y}}{\sigma_Y} \right)$ definiert, wobei \bar{X} das arithmetische Mittel

und σ_X die Standardabweichung der Zahlenreihe darstellen.

GO-Cluster ist frei für die akademische Gemeinschaft verfügbar. Das Verfahren und das Programm wurden zwischenzeitlich publiziert (Adryan und Schuh, 2004).

Ausgewählte funktionelle Gruppen aus der Analyse mit GO-Cluster. Auf Grundlage der GO-Annotation (Stand: 9. März 2004) konnten 77378x Gene teilweise redundant entsprechenden Termen zugeordnet werden. Von diesen Einträgen konnten 70438 (91,0%) mit zugehörigen Expressionsergebnissen assoziiert werden. Einige ausgewählte Gruppen sollen hier beispielhaft für die Kernexperimente im Kontext von BNL erläutert werden, wobei der Schwerpunkt auf der Gesamtsituation und nicht auf der Regulation einzelner Vertreter der funktionellen Gruppen liegt (siehe **Abbildung 26**). Von einer tiefer gehenden Analyse der Experimente mit SIMA und Hypoxie wurde aus Gründen der Komplexität allein der Kernexperimente abgesehen.

Die große Anzahl überrepräsentierter Gene lässt sich mit der Aktivierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren erklären. Durch die Überexpression im Stadium 14 werden über die Hälfte der GO-annotierten Faktoren (*GOid*: 3702 und 3700) transkriptionell aktiviert. Interessanterweise ist dies im Stadium 17 nicht mehr der Fall. Keiner dieser früh aktivierten Faktoren fehlt in der Mutanten. Transkriptionsfaktoren, die in der Mutantensituation unterrepräsentiert sind, erfahren meist nur eine geringe oder gar keine stärkere Aktivierung als im Wildtyp. Deutlich fällt auf, dass eine Reihe von Kinasen (*GOid*: 16301) in der Mutanten unterrepräsentiert sind. Einige von ihnen zeigen eine starke Aktivierung durch die Überexpression von BNL, unter anderem die Proteinkinase G, *foraging*, die bereits im Kontext der Tracheogenese diskutiert wurde (Wingrove und O'Farrell, 1999). Ein Großteil von Peptidasen (*GOid*: 4175) und Metallopeptidasen (*GOid*: 8237) ist in der Überexpression überrepräsentiert. Dies deckt sich mit Daten aus der Überexpression von TRH (Dr. Stefan Luschnig, Universität Stanford, USA, persönliche Mitteilung). Auch Transportvorgänge über Zellmembranen (*GOid*: 5215) scheinen transkriptionell alteriert zu sein. Sehr prominent differentiell repräsentiert und schon auffällig in den vorangegangenen Analysen sind Faktoren der Immunabwehr (*GOid*: 6952), zu denen auch die Lysozyme (*GOid*: 6960) gehören. Ebenso kurios erscheinen Faktoren der Geschlechtsdetermination (*GOid*: 7530) und Ecdysis (*GOid*: 42303), da es für beide Prozesse zwar Zusammenhänge mit der FGF-Signalkaskade gibt, dies aber erst in der larvalen Entwicklung zum Tragen kommen sollte. Neben diesen Faktoren, die man nicht direkt erwartet hätte, fehlen wie bereits angeführt solche, die man erwarten würde: In der GO-Gruppe für Tracheogenese (*GOid*: 7424) erkennt man zwar einige kritisch BNL-abhängige Faktoren (PUT, MMP1, HDC, STAR, N), es lässt sich aber keiner der bekannten Signalwege auf dieser Datengrundlage eindeutig nachzeichnen.

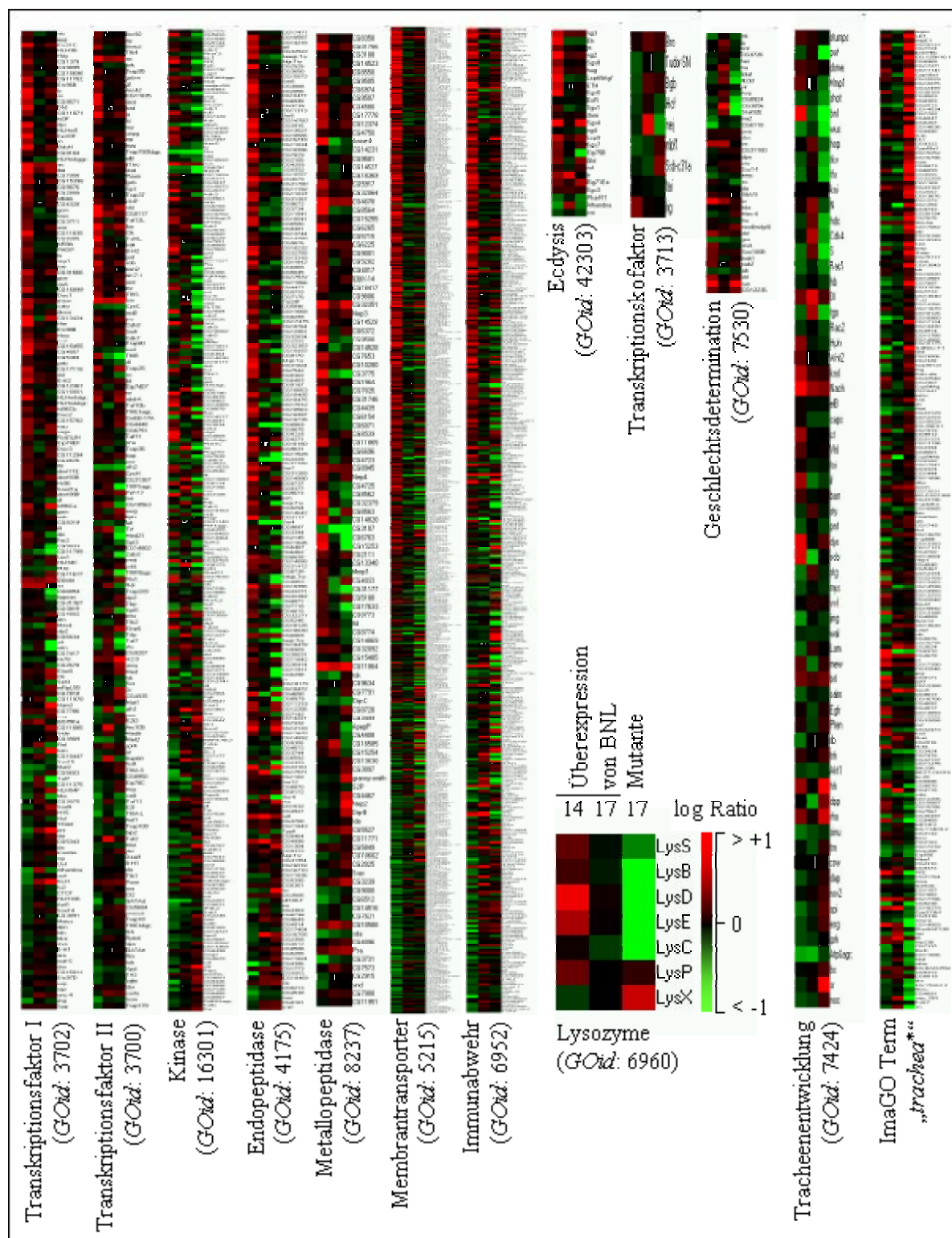


Abbildung 26: Ausgewählte funktionelle Gruppen aus der Analyse mit GO-Cluster. Gezeigt wird die graphische Repräsentation der Messwerte für die Überexpression von BNL in den Stadien 14 und 17 sowie die Mutantensituation im Stadium 17. Die Listen wurden auf eine gemeinsame Länge skaliert und sind zwischen 65 (GOid: 7424) und über 300 (GOid: 5215) Gene lang. Die Interpretation der Daten sei am Beispiel der Lysozyme (GOid: 6960) erklärt, analoges gilt für alle anderen Gruppen: Die Gene sind aufgrund der Ähnlichkeit in ihrer Regulation sortiert. Deutlich erkennt man, dass der Großteil der Lysozyme in der Überexpressionssituation im Stadium 14 (Spalte 1) geringfügig überrepräsentiert ist und im Stadium 17 (Spalte 2) weitgehend unverändert bleibt. Zusätzlich erkennt man, dass die Lysozyme in der Mutantensituation im Stadium 17 (Spalte 3) deutlich unterrepräsentiert sind. Dies spricht für eine kritische Abhängigkeit der Lysozyme von BNL.

Identifikation kritisch BNL-abhängiger trachealer Gene durch Hochdurchsatz *in situ*-Hybridisierungen und Analyse mit GO-Cluster. Im Rahmen des *Berkeley Drosophila Genome Projects* (BDGP) sind automatisierte *in situ*-Hybridisierungen und entsprechende Dokumentation von allen verfügbaren cDNAs geplant (Tomancak et al., 2002). Eine Klassifikation der Bilddaten erfolgt einerseits durch Kuratoren, andererseits auch durch computergestützte Verfahren der Objekterkennung. Für die eindeutige Benennung morphologischer Strukturen wurde das GO-angelehnte anatomische Beschreibungsvokabular ImaGO geschaffen. Die ImaGO-Datenbank ist unter <http://www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl> frei abrufbar, die Bilddaten können ebenfalls eingesehen werden. In seiner Grundstruktur ist ImaGO kompatibel zu GO-Cluster.

Es wurden die cDNA-Bezeichner aller Terme, die „*trachea*“ als Namenbestandteil tragen, in GO-Cluster importiert (Stand: März 2004). Für 238 der cDNAs konnten entsprechende Gene gefunden werden, von denen 235 mit einer Sonde vertreten waren. Nach der Gruppierung der Daten (siehe **Abbildung 26**, rechts) wurden diejenigen als BNL-abhängige Tracheengene identifiziert, die durch Überexpression in wenigstens einem Stadium überrepräsentiert und in der Mutanten unterrepräsentiert waren. Auch wurden einige Gene selektiert, die im Wildtyp zwar vorhanden, jedoch in der Mutantensituation deutlich überrepräsentiert sind. Beide Gruppen sind in **Tabelle 8** zusammengefasst.

FBid	CGid	Symbol	Name	putative Funktion
FBgn0003716	CG14026	<i>tkv</i>	<i>thickveins</i>	TGF- β -Signalweg
FBgn0016917	CG4257	<i>stat92E</i>	<i>signal-transducer and activator of transcription at 92E</i>	STAT-Transkriptionsfaktor
FBgn0020278	CG5248	<i>loco</i>	<i>locomotion defects</i>	kleine GTPase
FBgn0025641	CG14622	CG14622		Aktin-bindend
FBgn0026597	CG7926	<i>axn</i>	<i>axin</i>	Wnt-Signalweg
FBgn0029749	CG15786	CG15786		
FBgn0031461	CG16987	<i>alp23B</i>	<i>activin like protein at 23B</i>	TGF- β -Signalweg
FBgn0032661	CG15151	<i>pfe</i>	<i>pray for elves</i>	Rezeptor-Tyrosinkinase
FBgn0033604	CG9070	CG9070		
FBgn0033835	CG18279	IM10	<i>immune induced molecule-10</i>	Immunabwehr
FBgn0036053	CG6718	CG6718		Ca ²⁺ -unabhängige Phospholipase
FBgn0037720	CG8312	CG8312		Phosphotyrosin-interagierend
FBgn0037838	CG4089	CG4089		
FBgn0038017	CG4115	CG4115		
FBgn0038476	CG5175	CG5175		
FBgn0039609	CG14529	CG14529		Metalloprotease
FBgn0040060	CG6457	<i>yip7</i>	<i>yippee interacting protein 7</i>	Endopeptidase
FBgn0052548	CG32548	CG32548		
FBgn0035802	CG33167	CG33167		Rho-GEF
FBgn0026077	CG10287	<i>gasp</i>		extrazellulär
FBgn0031097	CG17052	CG17052		extrazellulär
FBgn0033942	CG10112	CG10112		
FBgn0035513	CG1259	CG1259		kutikulär
FBgn0052209	CG32209	CG32209		Lipoprotein-Rezeptor
FBgn0052499	CG32499	CG32499		

Tabelle 8: Durch GO-Cluster ermittelte ImaGO-annotierte Gene der Tracheogenese mit Abhängigkeit von BNL. Die oberen Gene werden durch BNL aktiviert, die sechs der unteren Gruppe sind in der Mutanten aktiviert.

2.3.3 Die graphische Repräsentation von Messwerten in Signalnetzwerken bestätigt die Aktivierung mehrerer Signalkaskaden

Bei der Zusammenfassung von Genen gleicher biologischer Prozesse geht die *Kyoto Enzyklopädie der Gene und Genome* (KEGG: <http://www.kegg.org>) noch einen Schritt weiter als die GO-Datenbank. Zwar ist der Datenbestand von KEGG bei weitem nicht so umfangreich wie der von GO, es werden aber die funktionellen Zusammenhänge zwischen Genprodukten der wichtigsten metabolischen Prozesse und Signalachsen in Flussdiagrammen dargestellt (Kanehisa und Goto, 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Applikation KEGG-Browser entwickelt, welche die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse farbig kodiert auf die frei verfügbaren Flussdiagramme projiziert und somit eine visuelle Identifikation biologischer relevanter Koregulation ermöglicht.

Lokale Datenbankinfrastruktur und Programmentwicklung. Die Datengrundlage zur Erstellung von etwa 100 Flussdiagrammen verschiedener metabolischer Prozesse und bekannter Signalkaskaden ist unter <ftp://ftp.genome.ad.jp/pub/kegg/pathways> frei verfügbar. Ein vollständiger Datensatz besteht aus 12 Dateien, die Informationen zu sämtlichen Genbezeichnungen, enzymatischen Reaktionen und Referenzen auf externe Datenquellen beinhalten. Die für die vorliegende Arbeit wichtigsten Komponenten waren die Flussdiagramme im *Graphics Interchange Format* .GIF und die Dateien im .conf- und .gene-Format. Es wurde von mir eine Konvertierungsverfahren entwickelt, welches die für die Rekonstruktion der Flussdiagramme notwendigen minimalen Daten aus diesen Dateien extrahiert und in Tabellen des lokalen MySQL-Datenbanksystems speichert. Es handelt sich dabei um die interne Nummer des Prozesses, seinen Namen, und die Pixel-Koordinaten für jedes im Flussbild vorkommende Genprodukt mit CG-Nummer. Wird nun ein biologischer Prozess in der Anwendung ausgewählt, so wird das Flussdiagramm dargestellt und für jeden Eintrag eines Genprodukts überprüft, ob dafür Genexpressionsdaten vorliegen. Die Projektion erfolgt dann farbig kodiert.

Ausgewählte Beispiele der Analyse mit dem KEGG-Browser. Ursprünglich war das Programm für die Untersuchung an metabolischen Prozessen unter Hypoxie erstellt worden. Schnell war jedoch klar, dass die Datengrundlage mit nur einem Replikat keinen günstigen Ausgangspunkt für eine Analyse darstellte. Auch die Betrachtung der SIMA-Überexpressionssituation ergab uneinheitliche Ergebnisse. Der Grund hierfür mag in der Biologie der hypoxischen Reaktion liegen.

Bei der vorherigen Analyse mit GO-Cluster deutete sich an, dass auch Komponenten anderer Signalkaskaden durch Überexpression von BNL transkriptionell überrepräsentiert sind. Mit dem KEGG-Browser war es möglich, diesen potentiellen Mechanismus der Aktivierung genauer zu bestimmen (siehe **Abbildung 27**). Es zeigt sich, dass der JAK/STAT-Signalweg, die TGF-Signalkaskade, das NOTCH/DELTA-System als auch Komponenten der ERK-Signalkaskade differentiell repräsentiert sind. Da am Ende all dieser Signalwege wiederum Transkriptionsfaktoren stehen, erscheint die Vielzahl an Kandidaten durch die Genexpressionsanalyse nicht mehr überraschend.

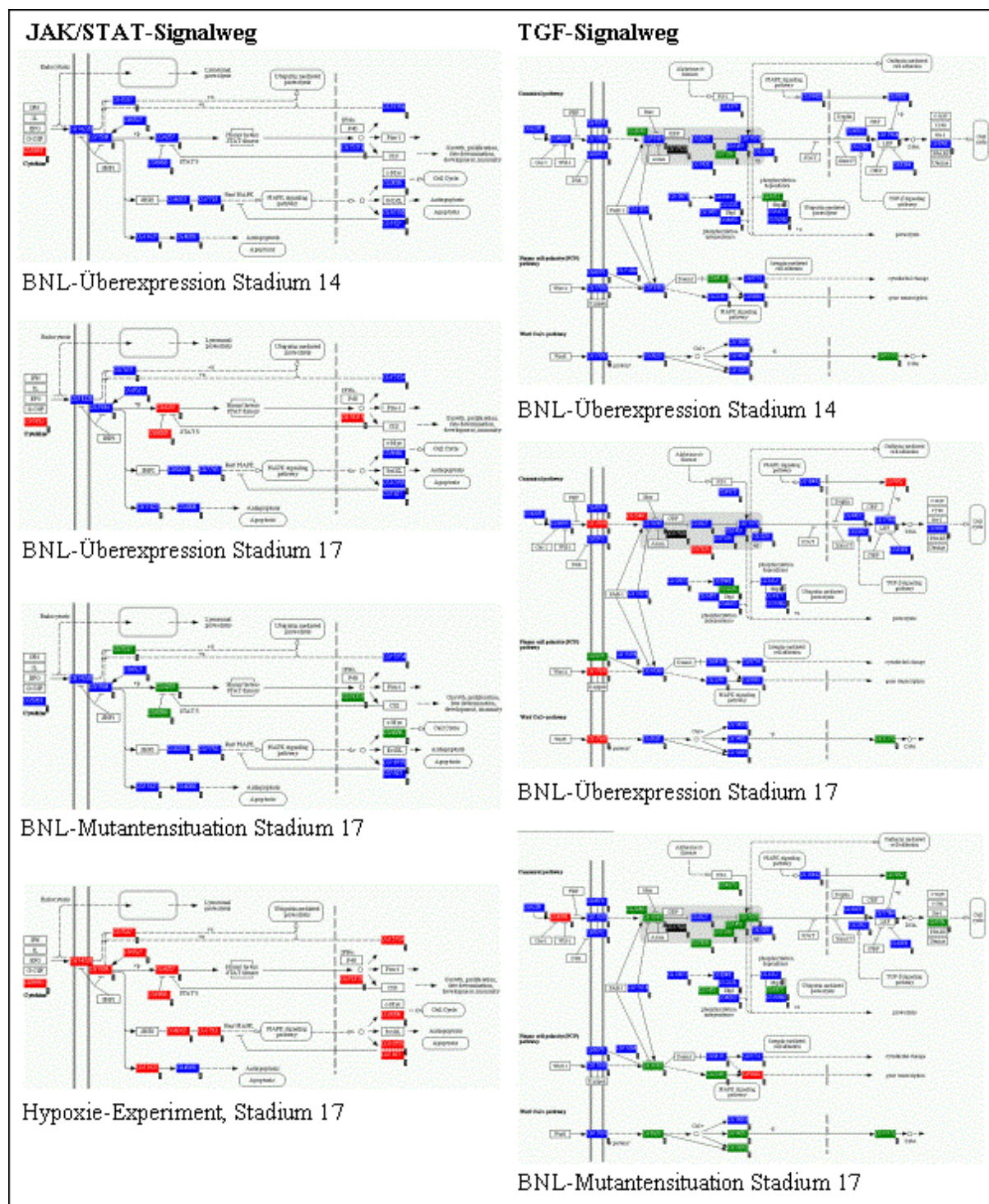


Abbildung 27: Flussdiagramme für die Signalwege von JAK/STAT und TGF-β mit Einblendung von Expressionswerten in KEGG-Browser. Die Farbkodierung bedeutet: schwarz, nicht als Sonde vertreten; blau, keine Regulation; rot, Ratio > 0,5; grün, Ratio < 0,5. Es fällt insbesondere im Falle der JAK/STAT-Kaskade auf, dass durch die Überexpression von BNL im Stadium 14 zunächst nur ein zytokinartiger Faktor (UPD) überrepräsentiert erscheint. Bis zum Stadium 17 sind noch weitere Komponenten der Signalkaskade betroffen, insbesondere der Transkriptionskofaktor NEJ, der auch als Gen der Tracheogenese annotiert ist. Im Vergleich hierzu sind diese Faktoren in der Mutantensituation unterrepräsentiert. Unter Hypoxie scheint die Signalkaskade völlig außer Kontrolle zu geraten, auch für die meisten anderen Prozesse erscheinen die Flussdiagramme ähnlich überaktiviert. Im Falle der TGF-β-Signalkaskade erscheint in Stadienabhängigkeit die Überexpressionsituation zunächst uneinheitlich. Deutlich fällt aber die Unterrepräsentation der Komponenten in der Mutantensituation auf. Die Regulation von Signalkaskaden auf Ebene der Transkription ist eher ungewöhnlich, eventuell werden hier die positiven und negativen Rückkopplungseffekte der Signalkaskaden beobachtet.

2.3.4 Die Datenbankanalyse identifiziert die chromosomale Lokalisation gekoppelter transkriptioneller Aktivität

Die Aktivierung von Genen geschieht nicht nur monogenetisch. Auch wirken Chromatin modifizierende Proteine, die auf übergeordneter Ebene den Zugang spezifischer Transkriptionsfaktoren zur DNA-Matrize ermöglichen. Daher könnte es sich als vorteilhaft erweisen, wenn sich im selben biologischen Kontext benötigte Gene in molekularer Nachbarschaft befinden würden, so dass die Auflockerung des Chromatins nur an wenigen transkriptionell aktiven Stellen stattfinden muss. Es wurde daher überprüft, ob sich ein solches Phänomen als Reaktion auf die verschiedenen Missexpressionssituationen beobachten lässt.

Lokale Datenbankinfrastruktur und Programmentwicklung. Die chromosomale Abfolge der Gene wurde der Datei *idmap.tsv* (Datenstand: 23. März 2004) aus dem Genomkartenverzeichnis von FlyBase entnommen, das unter <http://www.flybase.org/maps/lk/gnomap> frei verfügbar ist. Grundstruktur (Felder: *FBid*, *Chromosomenarm*, *Startnukleotid*, *Endnukleotid*) und Datenabfolge wurden in eine Tabelle in der lokalen MySQL-Datenbank übernommen. Über die Abbildung *FBid* > *CG-Nummer* aus der lokalen Referenztabelle konnten chromosomale Lokalisationen direkt mit Sonden auf dem *Chip* assoziiert werden. Es konnten so 10116 Gene auf die 11520 verfügbaren Lokalisationen abgebildet werden.

Das für die Auswertung entwickelte Programm fragt für jede verfügbare chromosomale Lokalisation den durchschnittlichen Ratio der logarithmierten Signalintensitäten aus einer Datei mit den *Chip*-Experimenten ab. Dazu bildet es den Durchschnitt aus den Werten der Kreuzkorrelation von Kontroll- und Testreplikaten. Direkt aufeinander folgende Einträge mit durchschnittlichem Ratio > 0 (Überrepräsentation) oder < 0 (Unterrepräsentation) werden als Kette gewertet, die mit Länge, Summe der addierten Ratios und den CG-Nummern der zugehörigen Probesets protokolliert werden. Eine typische Protokolldatei hat somit die Struktur:

```
<Analyse>
  <Experiment>Überexpression btl-GAL4; UAS-bnl, Stadium 17</Experiment>
  <Überrepräsentiert>
    <Kette>
      <Kettenlänge>2</Kettenlänge>
      <Gesamtintensität>0,182255313</Gesamtintensität>
      <Eintrag>
        <Chromosom>2R</Chromosom>
        <Startnukleotid>11509711</Startnukleotid>
        <Gen>CG15925</Gen>
        <SigLogRatio>0,04958</SigLogRatio>
        <Endnukleotid>11511239</Endnukleotid>
      </Eintrag>
      <Eintrag>
        <Chromosom>2R</Chromosom>
        <Startnukleotid>11548566</Startnukleotid>
        <Gen>CG15712</Gen>
        <Ratio>0,3882825</Ratio>
        <Endnukleotid>11549265</Endnukleotid>
      </Eintrag>
    </Kette>
  </Überrepräsentiert>
</Analyse>
```

Es zeigt sich, dass eine Glättung der Werte über ein Fenster von 2 Einträgen (Werte n und $n+1$) die durchschnittliche Kettenlänge deutlich verlängert, da einzelne Ausreißer übersprungen werden (Daten nicht gezeigt). Alle Auswertungen wurden daher mit dieser Option durchgeführt.

Nach dem Import der Daten in MS Excel wurden für jedes Experiment die Kettenlängen und Signalintensitäten in Histogrammen ausgewertet (Daten nicht gezeigt). Beides folgte in allen Fällen hypergeometrischen Verteilungen, mit einer großen Anzahl von Ketten der Länge 1 (und entsprechend geringer Gesamtintensität) und wenigen Einträgen längerer Ketten (bis Länge 34 bei BNL-Überexpression im Stadium 14, oder der Gesamtintensität 28,77 bei BNL-Überexpression im Stadium 17). Eine Übersicht über die Verteilung der Ketten auf die einzelnen Experimente bietet **Abbildung 28**.

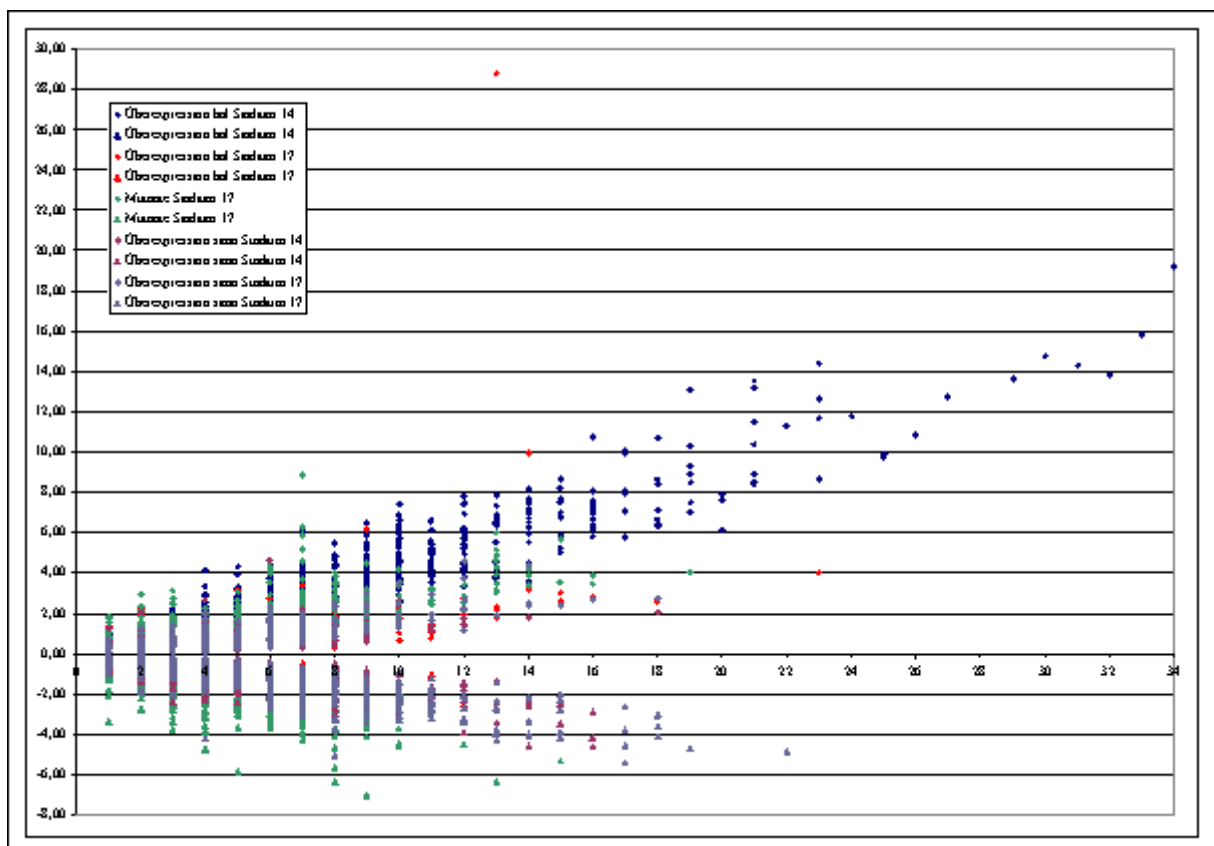


Abbildung 28: Anzahl der Gene (Kettenlänge) und Ratiosumme der logarithmierten Signalintensitäten für verschiedene Experimente. Auf der Abszisse ist die Anzahl der Gene in zusammenhängend über- (Rauten) oder unterrepräsentierter (Dreiecke) chromosomaler Abschnitte abgetragen, auf der Ordinate die Summe der Ratio logarithmierter Signalintensitäten. Man erkennt für die meisten Ketten eine relativ lineare Korrelation zwischen Kettenlänge und Summe. Besondere Beachtung verdient eine Kette der Länge 13 mit einer Signalintensität von 28,77. Sie wurde eingehend untersucht.

Im Regelfall verhalten sich Kettenlänge und Signalintensität in etwa linear zueinander. Der durchschnittliche Ratio Signalintensität durch Kettenlänge ist über alle Experimente im Falle der Überrepräsentation $0,2 \pm 0,1$ und bei Unterrepräsentation $-0,18 \pm 0,05$. Als interessant wurden vor

allen diejenigen Datenpunkte gewertet, bei denen Kettenlänge und Signalintensität nicht linear korrelierten.

Die chromosomale Region 55C4-6 beherbergt eine Reihe zueinander homologer Gene mit putativer Immunfunktion, die unter ektopischer Expression von *branchless* aktiviert sind. Am deutlichsten fällt der Datenpunkt mit der Gesamtintensität 28,77 aus dem Experiment *btl*-GAL4 x UAS-*bnl* im Stadium 17 auf. Obwohl die Kette nur 13 Gene lang ist, addieren sich die Ratio der logarithmierten Signalintensitäten zu einer Gesamtintensität zusammen, die mehr als 50% größer ist als diejenige der längsten beobachteten Kette (Länge 34, Gesamtintensität 19,19). Im Durchschnitt trägt jedes Gen also mit einem Ratio von $28,77 / 13 = 2,21$ zum Gesamtsignal bei. Die Auftragung der Signalratio entlang der Chromosomenachse zeigt, dass hauptsächlich 9 Gene zu dem hohen Gesamtsignal beitragen, die von 4 Genen weit geringerer Intensität flankiert werden (siehe **Abbildung 29**).

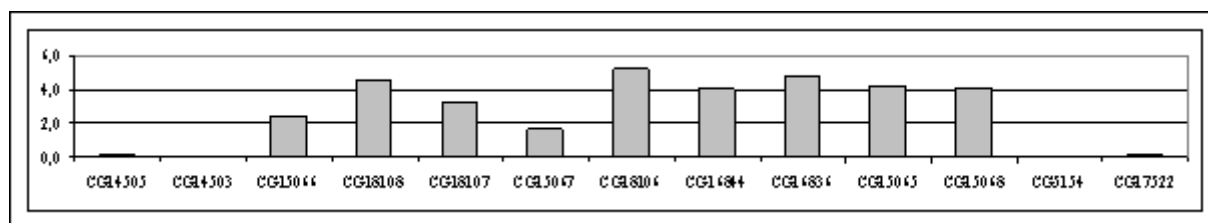


Abbildung 29: Genfolge und Intensitätsverteilung des chromosomalen Bereichs 55C4-55C6 nach Überexpression von BNL im Stadium 17. Es handelt sich hierbei um die Kette mit der größten Gesamtintensität im Vergleich aller Experimente. Zur ihr tragen hauptsächlich die 9 zentral liegenden Gene bei, die jeweils nur zwischen 0,1-1 kb voneinander getrennt liegen.

Wie in vorangegangenen Analysen wurden erneut die Gene CG18106, CG18108 und CG15065 identifiziert. Interessanterweise haben 5 (CG15066, CG18108, CG18106, CG16844 und CG17522) der 13 im dargestellten chromosomalen Locus gelegenen Gene eine Annotation als Immunfaktor. Es stellte sich daher die Frage, ob die Gene innerhalb dieser Region eine ähnliche molekulare Architektur aufweisen. Hierfür wurden die Primärsequenzen der betreffenden Gene mit ClustalW (auf dem Server des European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>) untersucht. Für 7 der 13 Gene konnte eine deutliche Ähnlichkeit festgestellt werden:

CG18108	MKFFSVVTVF	VLGLLAVANA	VPLSPDPGNV	IINGDCRVCN	VHGGK	45	AS
CG18107	MRFFAIVTVF	VLGLLALANA	IPLSPDPGNV	IINGDCVNCN	VRGGK	45	AS
CG18106	MKFFSVVTVF	VFGLLALANA	VPLSPDPGNV	VINGDCKYCN	VHGGK	45	AS
CG16844	MKFLSLA--F	VLGLLALANA	TPLNP--GNV	IINGDCRVCN	VRA	39	AS
CG16836	MKALQVAG-T	LMLLFCLLAA	VNATP--GQV	YINGKICIDCN	KPDND	gekürzt,	76 AS
CG15065	MKWMSLV--F	LCGLLAMAVA	SPLNP--GNV	IINGDCRHCN	VRGG	40	AS
CG15068	MKLLSIT--F	LFGLLALASA	NPLSP--GNV	IINGDCKVCN	IRGD	40	AS
	*: : : .	: * : . : *	. *	*: * * * * *	* *		

Exkurs: Funktionstest. Die putativ antimikrobiellen Peptide wurden einem funktionellen Test unterzogen, da ihre Annotation auf Sequenzähnlichkeit zu Peptiden beruht, die bei einer Proteomanalyse bakteriell infizierter adulter Fliegen als stark exprimiert entdeckt wurden (Uttenweiler-Joseph et al., 1998). Dafür wurden die entsprechenden cDNAs in Expressionsvektoren kloniert und das bakterielle Wachstum unter induzierenden Bedingungen beobachtet. Es zeigte sich kein Unterschied zur mit Leervektor transformierten Kontrolle. Das Ergebnis dieses Trivialansatzes bedeutet jedoch nicht, dass es sich bei den untersuchten Faktoren nicht um antimikrobielle Peptide handelt. Zum einen könnte es sein, dass die Peptide gegen völlig andere Zielorganismen gerichtet sind, wie beispielsweise Pilze. Zum anderen ist es denkbar, dass sie erst gegen Bakterien aktiv werden, wenn sie exogen einwirken, und nicht, wenn sie endogen exprimiert werden. Und letztlich ist nicht bekannt, ob die putativ antimikrobiellen Peptide nicht durch andere Kofaktoren modifiziert werden müssen, bevor sie ihre Wirkung zeigen können.

Die Aktivierung von benachbart liegenden Genen folgt teilweise einem Muster. Bei genauer Betrachtung von **Abbildung 30** fällt auf, dass die in der Kette zentral liegenden Gene stärker aktiviert werden als die am Rand gelegenen. In einem Modell, in dem transkriptionelle Aktivität auch über Chromatin modifizierende Gene und auf allen Ebenen chromosomaler Kondensation reguliert wird, könnte man annehmen, dass größere chromosomale Bereiche relativ unspezifisch aktiviert werden und lateral zu dem oder den Zielgenen ebenfalls verstärkte Transkription beobachtet werden kann.

Für die Überexpression von BNL im Stadium 17 wurden daher noch weitere Ketten überrepräsentierter Gene analysiert. Es zeigte sich für etwa 25% der Ketten größerer Länge (mehr als 10 Gene, etwa 150 ± 100 kb) eine relative Normalverteilung der Ratio logarithmierter Intensitäten. Zwei Beispiele sind in **Abbildung 30** dargestellt.

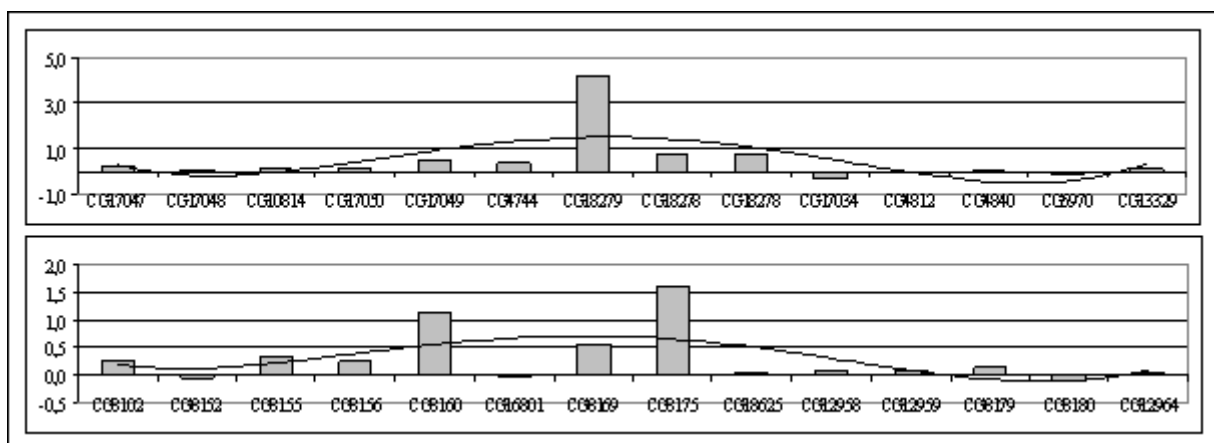


Abbildung 30: Genfolge und Intensitätsverteilung der chromosomalen Bereiche 50A1-50A11 (oben) und 51F3-52A5 (unten) nach Überexpression von BNL im Stadium 17. Die Darstellung erfolgte analog zur vorangegangenen Abbildung. Zusätzlich wurde basierend auf den Daten mit MS Excel eine polynomielle Trendlinie (4 Freiheitsgrade) eingefügt, welche die schwerpunktmäßige Verteilung der Intensitätswerte verdeutlichen soll.

Es wurde untersucht, ob diese meist mehr als 150 kb großen chromosomalen Abschnitte exklusiv für die Überexpression von BNL im Stadium 17 sind, oder ob es sich um Regionen handelt, die auch unter anderen Bedingungen gemeinsam aktiviert werden. Dafür wurden sämtliche Ketten überrepräsentierter Gene aller Experimente (außer des Hypoxie-Experiments) auf regionale Überlappung überprüft. Tatsächlich findet man auf allen Chromosomen bereiche, die sogar in zwei oder mehr Experimenten transkriptionell aktiv sind (ein Beispiel ist in **Abbildung 31** gegeben).

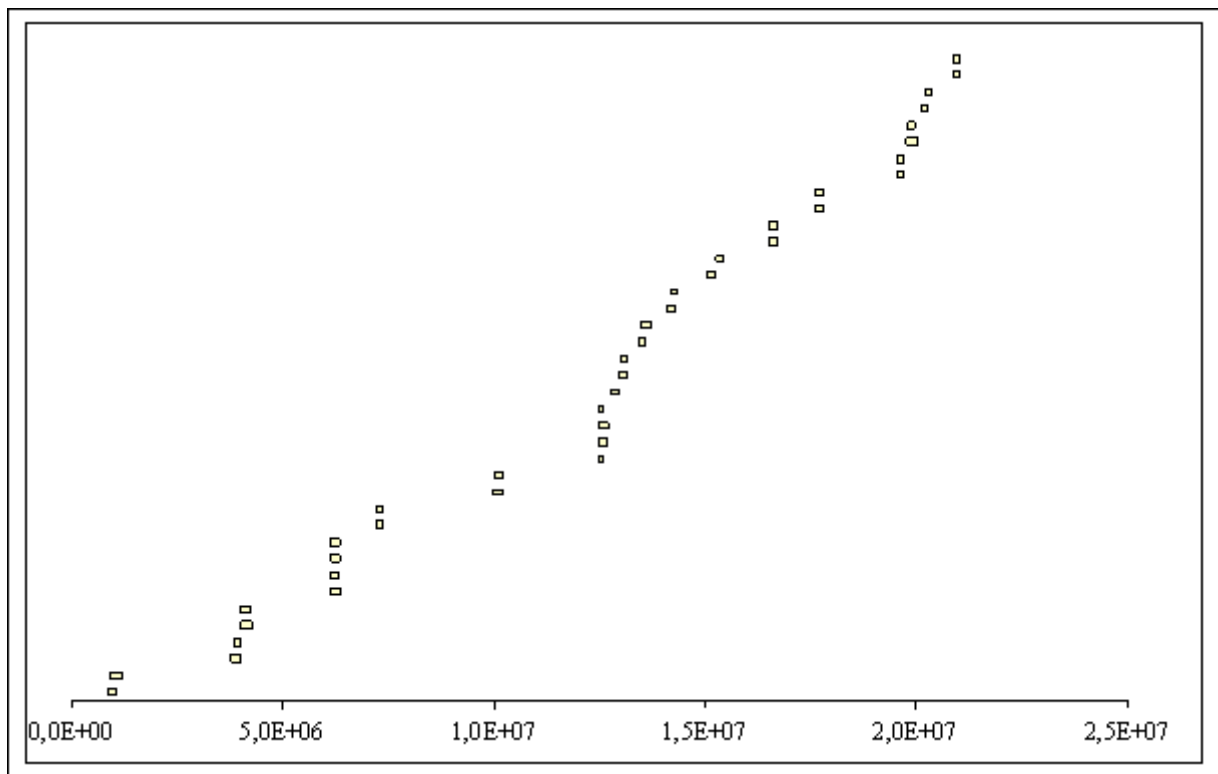


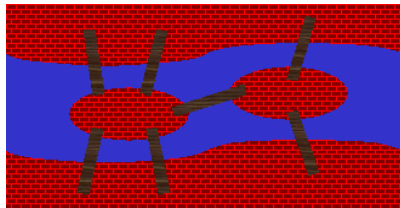
Abbildung 31: Beispielhafte Darstellung für chromosomale Regionen, die unter mehreren experimentellen Bedingungen aktiviert werden. Hier Chromosom 2L. Auf der Abszisse ist die Nukleotidnummer abgetragen (von Zentromer nach Telomer). Jede Box bezeichnet eine transkriptionell aktivierte Region in einem nicht näher spezifizierten Experiment. Übereinanderstehende Boxen sind also unter mehreren experimentellen Bedingungen aktiviert.

Die Gene einiger exemplarischer Gebiete, die unter mehreren Bedingungen aktiviert werden, wurden auf ihre Funktion hin überprüft. Es war keine Spezifität für bestimmte Funktionen oder Strukturen zu erkennen. Die ermittelten chromosomalen Regionen stimmen sowohl in ihrer Quantität (Anzahl, Länge) als auch in ihrer Qualität (Funktion der Gene) mit publizierten Daten anderer *GeneChip*-Versuche überein (Spellman und Rubin, 2002).

2.3.5 Die Projektion von Genexpressionsdaten auf biochemische und genetische Interaktionen verdeutlicht komplexe Zusammenhänge des Zellgeschehens

Das Genom von *Drosophila* war das zweite vollständig sequenzierte für einen mehrzelligen Organismus überhaupt (Adams et al., 2000). Dies machte die Fruchtfliege nicht nur für die Grundlagenforschung interessant, sondern auch attraktiv als Objekt industrieller Forschung mit ihren Hochdurchsatzmethoden. Die Fliege etablierte sich so neben Hefe zu einem weiteren Modellsystem für bioinformatische Analysen, da die anfallenden Datenmengen kaum manuell zu bearbeiten sind.

Biochemische und genetische Experimente lassen logische Verknüpfungen von Genen der Form „Protein A interagiert mit Protein B“, „Gen A verstärkt Gen B“ oder „Gen A supprimiert Gen B“ zu. Interagieren nicht nur „A“ und „B“, sondern beliebig viele Komponenten, und sind die Komponenten nicht auf eine Interaktion limitiert, so entsteht ein Interaktionsnetzwerk. Mathematisch ist dies ein Graph, in dem die Komponenten die Knoten darstellen und die Interaktionen die Kanten. Man kann in einem solchen Graphen beispielsweise nun die Frage nach den längsten Pfaden („A interagiert mit B, B interagiert mit C, C interagiert...“) stellen und somit den Zusammenhang nicht unmittelbar verbundener Knoten aufklären, oder die Wichtigkeit bestimmter Knoten für den Zusammenhalt zweier Subnetzwerke bestimmen. Die Klärung dieser Fragen ist nur für eine kleine Anzahl von Knoten und Kanten trivial; über die Grenzen der Mathematik bekannt geworden sind sie als Problem des



Handlungsreisen oder durch den Mathematiker Euler als Königsberger Brückenproblem.

Abbildung 32: Das Königsberger Brückenproblem nach Euler. Lässt sich ein Brückenspaaziergang über die sieben Brücken Königsbergs realisieren, ohne auch nur eine einzige Brücke zweimal zu überqueren?

Graphentheoretische Ansätze finden seit wenigen Jahren in der Molekularbiologie ihren Einsatz, vor allem für einzellige Organismen mit einer vergleichbar überschaubaren Anzahl an Komponenten. Ihre Proteininteraktionen und Genexpression unter verschiedenen Bedingungen werden so korreliert, dass eine systembiologische Erklärung des Zellgeschehens möglich ist (zur methodischen Übersicht: Barabasi und Oltvai, 2004; Friedman, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde dies mit zwei verschiedenen Datenmengen versucht:

- **Die Protein-Protein-Interaktionsdatenbank der Firma CuraGen (New Haven, CT, USA).** Von der Firma CuraGen sind seit Ende 2003 die Ergebnisse von 2-Hybrid-Untersuchungen an 6978 Proteinen von *Drosophila* frei für die akademische Gemeinschaft verfügbar (Giot et al., 2003). Die Datensätze sind von Kuratoren nach verschiedenen Qualitätsmerkmalen in zwei Klassen unterteilt worden, von den 41552 Interaktionen der 6978 Proteine gelten 9433 Interaktionen zwischen 4601 Proteinen als „sicher“.

- **Die genetischen Interaktionen von *Drosophila*.** Die funktionelle Annotation von Genen in FlyBase wird unter anderem durch Kuratoren vorgenommen, welche die wissenschaftliche Literatur kritisch auswerten. Überzeugt eine genetische Interaktion, wird die in einer Tabelle der Form „A interagiert mit B“ festgehalten, wobei zwischen verstärkenden und supprimierenden Effekten unterschieden wird.

Lokale Datenbankinfrastruktur und Programmentwicklung. Die Interaktionsdatenbank von CuraGen war zum Zeitpunkt der Analyse nur für einzelne Gene abfragbar (Stand: Dezember 2003). Von mir wurde daher ein Programm entwickelt, das vollautomatisch jeden Eintrag der Datenbank (verfügbar unter <http://portal.curagen.com/cgi-bin/interaction/flyHome.pl?modeIn=List>) abfragt und die entsprechenden Interaktionen in eine lokale MySQL-Tabelle der Form *interne Nummer von Interaktor 1, CG-Nummer von Interaktor 1, interne Nummer von Interaktor 2, CG-Nummer von Interaktor 2, Interaktionsqualität* abspeichert. Die Liste der genetischen Interaktionen wurde aus der Datei *fbgn-geneinter.tsv* aus dem Verzeichnis <ftp://flybase.net/flybase/genes/> von FlyBase bezogen. Zum Zeitpunkt der Analyse waren 1012 Gene mit 4401 Interaktionen aufgelistet (Stand: April 2004).

Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Verfahren und Programm entwickelt, dass genau diejenigen Subgraphen aus dem Gesamtnetzwerk extrahiert, die

- nur Komponenten enthalten, deren Betrag der Regulation unter einer der experimentellen Bedingungen größer einem zu bestimmenden Grenzwert liegt,
- deren benachbarte Komponenten über alle experimentelle Bedingungen (den Genvektor) einen zu bestimmenden Korrelationskoeffizienten (nach Pearson) aufweisen. Dabei wurde berücksichtigt, dass bei supprimierenden Interaktionen im biologischen Sinne dann eine Aktivierung erfolgt, wenn die supprimierende Komponente in inverser Korrelation zur supprimierten Komponente steht.

Realisiert wird diese Anforderung nicht durch das Durchlaufen des Gesamtgraphen, da der Rechenaufwand mit steigender Anzahl von Knoten und Kanten exponentiell ansteigt (Ottmann und Widmayer, 2002). Vielmehr werden solche Komponenten und Einzelinteraktionen als Datengrundlage für das Rechenverfahren zugelassen, welche die beiden Bedingungen (a) und (b) erfüllen. Anschließend wird eine Verwandtschaftsmatrix erstellt und über einen rekursiven Rücksetzalgorithmus („Backtracking“-Verfahren) für jeden Knotenpunkt die unmittelbaren Nachbarn bestimmt, für die das rekursive Verfahren wieder angewandt wird. Dieser Schritt wird solange wiederholt, bis alle Knoten aus der Datengrundlage einmal (und nur einmal) besucht wurden. Die ermittelten Subgraphen wurden in eine Datei ausgegeben, die kompatibel zu einem Visualisierungswerkzeug ist.

Folgende Bedingungen wurden für die Analyse der beiden Interaktionsdatenbanken benutzt: Der Betrag der Ratio der logarithmierten Signalintensitäten soll unter einer experimentellen Bedingung $\geq 0,5$ sein, damit sichergestellt werden kann, dass man nur tatsächlich regulierte Komponenten betrachtet und nicht nur statistische Schwankungen. Es werden ausschließlich Interaktionen zwischen Komponenten zugelassen, deren Korrelationskoeffizient ≥ 0 ist, d.h., die unabhängig oder koreguliert sind, aber nicht konterreguliert (siehe dazu: **Abbildung 33**).

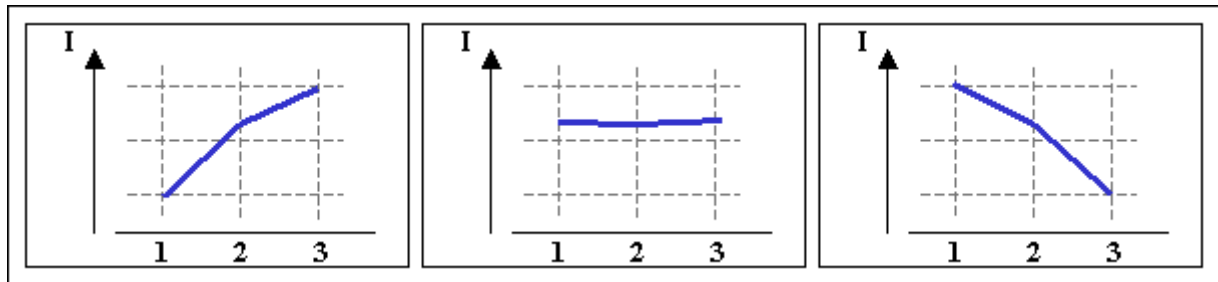


Abbildung 33: Die Bedeutung des Korrelationskoeffizienten über den Genvektor. Es sind die Intensitäten (I) von drei verschiedenen Genen (die drei Panele) unter den experimentellen Bedingungen 1, 2 und 3 dargestellt. Gen Eins wird kontinuierlich stärker, Gen Zwei bleibt stets konstant, Gen Drei fällt kontinuierlich ab. Zwei identisch exprimierte Gene hätten den Korrelationskoeffizienten 1. Die Gene Eins und Zwei haben den Korrelationskoeffizienten 0, ihr Verlauf ist unabhängig voneinander. Formal-mathematisch sind die Gene Eins und Drei konterreguliert, sie erhalten den Korrelationskoeffizienten -1.

Die Verknüpfung von Genexpressionsdaten und Protein-Protein-Interaktionsdaten zeigt nur wenige Interaktionen koregulierter Kandidaten. Für die Proteininteraktionsdatenbank von CuraGen ergibt die Vorfilterung für die Überexpression von BNL im Stadium 14 eine Startmenge von 363 Komponenten mit 258 Interaktionen, für die Überexpression im Stadium 17 eine Startmenge von 39 Komponenten mit 24 Interaktionen und für die Mutantensituation eine Startmenge von 242 Komponenten mit 161 Interaktionen. Die Häufigkeit der gefundenen Subgraphen folgt in Abhängigkeit von ihrer Größe einer hypergeometrischen Verteilung. Für die genauere biologische Bewertung wurden solche mit ≥ 8 Interaktionen ausgewählt, von denen es im Falle der Überexpression im Stadium 14 8 (siehe **Abbildung 34**), im Stadium 17 keinen und für die Mutantensituation 2 gab.

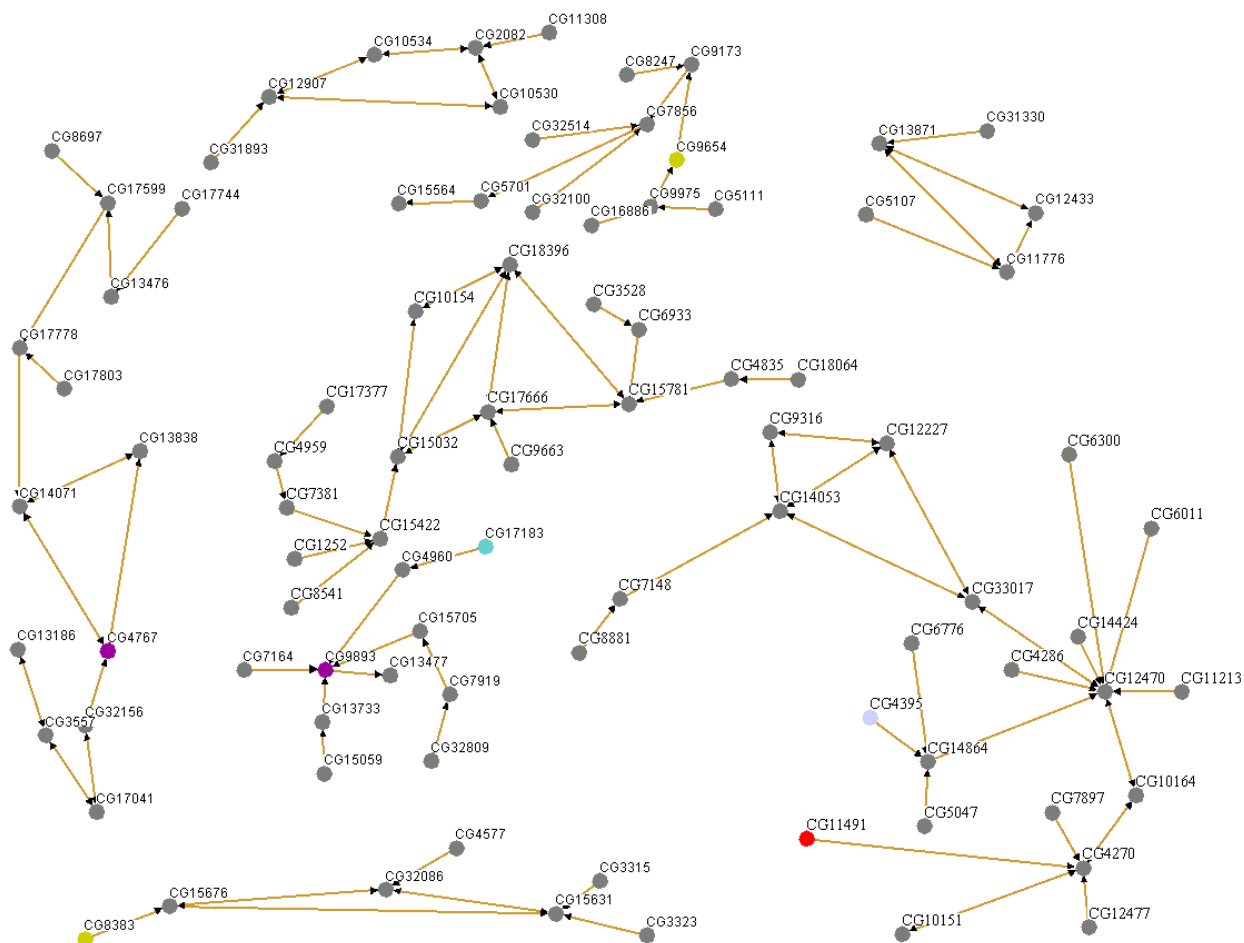


Abbildung 34: Darstellung von Protein-Protein-Interaktionsgraphen. Exemplarisch gezeigt sind die 8 Subgraphen für die Überexpression von BNL im Stadium 14. Die Farbkodierung der Knoten entspricht der GO-Annotation (grau: keine, zyan: Transkriptionsfaktor, violett: Strukturkomponente, grün: Enzym, rot: Immunität). Es wird deutlich, dass die wenigsten in der Datenbank von CuraGen aufgelisteten Proteine annotiert sind. Die genaue Anordnung der Knotenpunkte und die Länge der Kanten sind willkürlich von der Visualisierungskomponente gewählt und haben keine weitere Bedeutung.

Die in der CuraGen-Datenbank gefundenen putativ BNL-abhängigen Interaktionsketten lassen keine biologische Interpretation zu, da die meisten Proteine nicht funktionell annotiert sind. Da die Echtheit der in diesem Hochdurchsatzverfahren ermittelten Interaktionen sehr umstritten ist, wurde von einer weiterführenden Analyse abgesehen.

Die Verknüpfung von Genexpressionsdaten und bekannter genetischer Interaktionen gibt Hinweise auf die phänotypische Vielfalt der BNL-Überexpression. Die Vorfilterung für die Überexpression von BNL im Stadium 14 ergibt eine Startmenge von 38 Komponenten mit 41 Interaktionen, für die Überexpression im Stadium 17 eine Startmenge von 88 Komponenten mit 87 Interaktionen und für die Mutantensituation eine Startmenge von 136 Komponenten mit 207 Interaktionen. Auch hier folgt die Zuordnung von Graphengröße und Häufigkeit einer hypergeometrischen Verteilung. Aufgrund der Komplexität der resultierenden Interaktionsnetzwerke wurde jeweils der mit Abstand größte Subgraph näher betrachtet (siehe **Abbildung 35**).

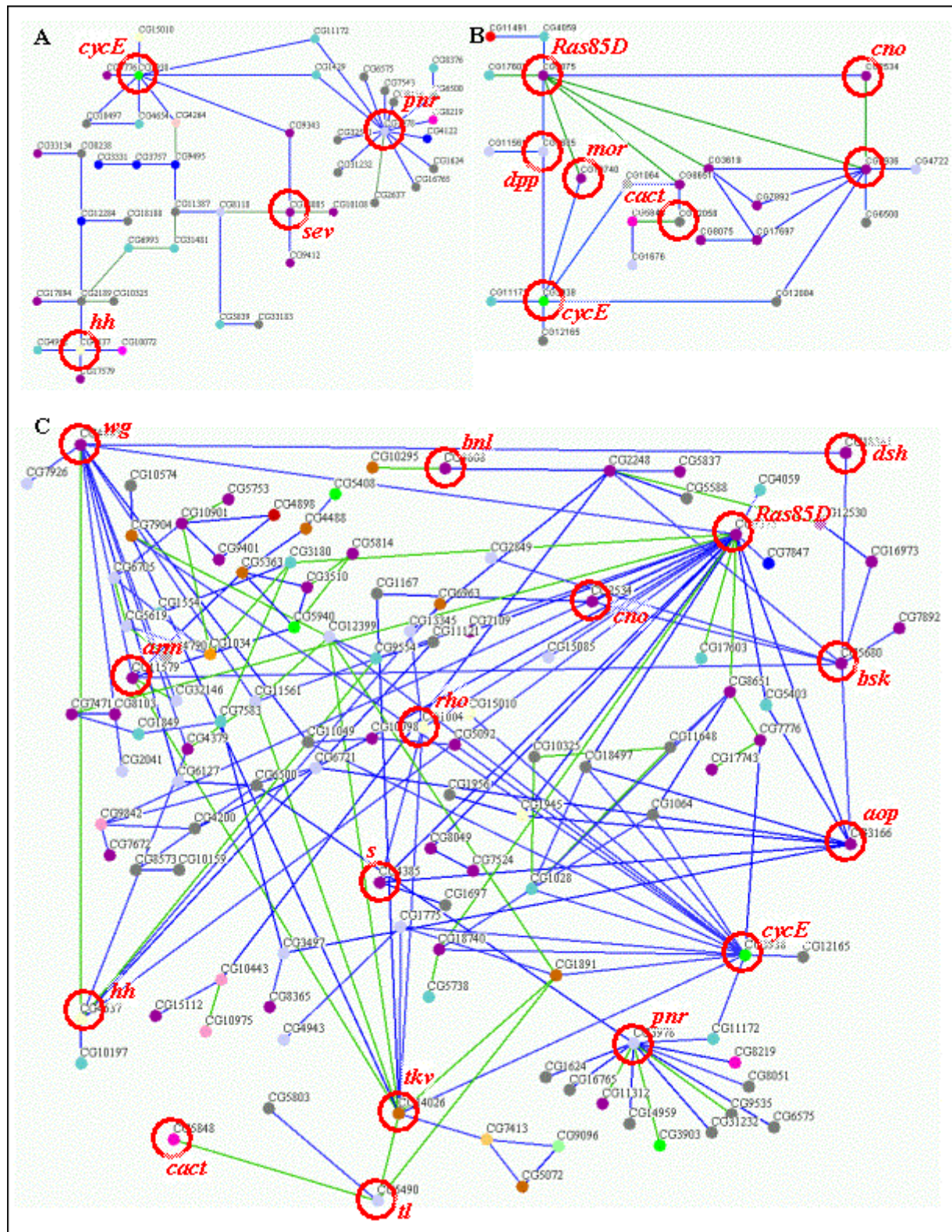


Abbildung 35: Darstellung putativ BNL-abhängiger genetischer Interaktionen. Die Farbkodierung der Knoten entspricht der GO-Annotation. Im Vergleich zu den Daten von CuraGen gibt es für die meisten der in der genetischen Interaktionsdatenbank aufgeführten Komponenten eine Annotation. Die Farbe der Kanten zeigt, ob es sich um eine positive Verstärkung (blau) oder um eine ausbleibende Hemmung (grün) handelt. Die genaue Anordnung der Knotenpunkte und die Länge der Kanten sind willkürlich von der Visualisierungskomponente gewählt und haben keine weitere Bedeutung. Einige prominente Gene bekannter Signalkaskaden sind besonders hervorgehoben.

Die gefundenen Subgraphen deuten an, dass die Überexpression von BNL mit einer transkriptionellen Kreuzaktivierung auch anderer Signalkaskaden verbunden ist. Im Stadium 14 ist dies beispielsweise die HEDGEHOG- und im Stadium 17 die NOTCH-Signalkaskade. Noch deutlicher wird dies bei Betrachtung der Gene, die in der Mutantensituation transkriptionell herunterreguliert erscheinen. Es handelt sich hierbei um die Signalkaskaden von HEDGEHOG, WINGLESS, DECAPENTAPLEGIC und TOLL. Auch Faktoren für die Restrukturierung des Chromatins (MOR, SNR1) treten in den Graphen auf. Interessanterweise gibt es Faktoren, die kritisch BNL-abhängig erscheinen und die zentrale Knotenpunkte in mindestens zwei Subgraphen darstellen. Es handelt sich dabei um die Kinasen CYCE und CNO sowie die GTPase RAS85D. Bemerkenswert ist die Tatsache deshalb, da die Verknüpfung der Signalkaskaden hauptsächlich über solche Superknoten läuft. Akzeptiert man ein Modell, in dem an diesen Verknüpfungspunkten unter ektopischen Bedingungen unspezifische Rückkopplungen erfolgen, so wäre es möglich, dass so beispielsweise die Verknüpfung von BNL über RAS85D und BSK zum bekannten Tracheengen AOP führt, welches wiederum die EGF-Signalkaskade über die transkriptionelle Aktivierung von S(TAR) vermittelt. Eine derartige Verknüpfung von Signalkaskaden in den Tracheen ist bisher nicht *in vivo* gezeigt, wohl aber von Systembiologen für einzellige Organismen mehrfach diskutiert (zur Übersicht: Barabasi und Oltvai, 2004).

2.4 Die Überprüfung der Genexpression durch *in situ*-Hybridisierung in fixierten Embryonen von Drosophila bestätigt die Ergebnisse der Transkriptomanalyse

Der Expressionswert aus der Transkriptomanalyse, die daraus abgeleitete statistische Bewertung und die tatsächliche transkriptionelle Regulation im Tier unter den experimentellen Bedingungen müssen nicht notwendigerweise korrelieren. Dies zeigt sich beispielsweise an *bnl*, welches in der Überexpression laut *in situ*-Befund sehr deutlich überrepräsentiert ist (Daten nicht gezeigt) und einen deutlichen Phänotyp zeigt, laut Genexpressionsanalyse aber nur marginal transkriptionell aktiviert wird und im Rahmen der statistischen Interpretation sogar eine geringere Transkriptmenge zeigen könnte. Die Ursachen für diesen Widerspruch sind mannigfaltig und reichen bis hin zur fehlerhaften Sondenauswahl durch den Hersteller. Daher ist es unerlässlich, die erhobenen Daten für Kandidaten mit mindestens einer weiteren Methode zu überprüfen. Da die *in situ*-Hybridisierung gegenüber der PCR- oder Northern-Analyse den Vorteil der räumlich-zeitlichen Auflösung bietet, wurde sie als Mittel der Wahl ausgewählt.

2.4.1 Die am auffälligsten regulierten Gene werden im Fettkörper exprimiert

Zunächst erschienen Kandidaten am attraktivsten, die unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen besonders stark differentiell repräsentiert sind. Besonders die kritisch von BNL abhängigen Faktoren, die in der Überexpressions- und Mutantensituation konterreguliert sind, waren

hier interessant. Wie in der vorliegenden Arbeit mehrfach diskutiert, handelte es sich hierbei weitgehend um putative Faktoren der Immunantwort. Exemplarisch soll hier das Erscheinungsbild von einem Vertreter, dem Gen *im1* des IMMUNE INDUCED MOLECULE-1 (IM1, CG18108), in der *in situ*-Hybridisierung dargestellt werden (siehe **Abbildung 36**).

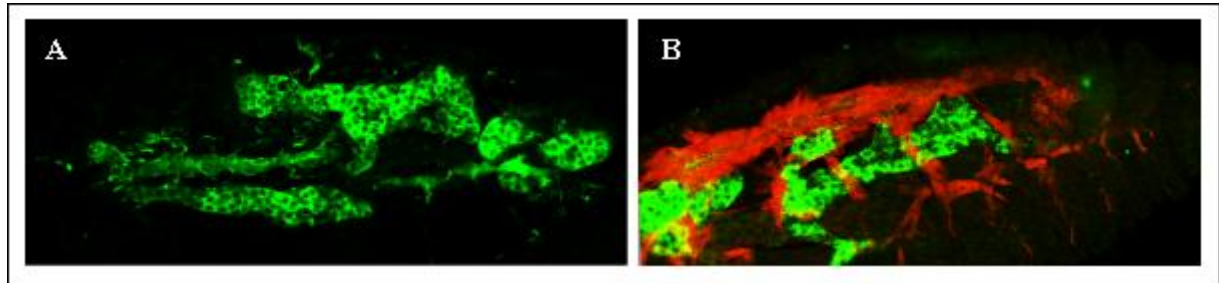


Abbildung 36: Konfokale Projektionen immunhistochemischer Anfärbungen von *antisense*-Sonden nach *in situ*-Hybridisierung. (A) *im1*-Transkript im späten *btl-GAL4; UAS-bnl* Embryo des Stadiums 17. (B) *im1*- (grün) und *lacZ*- (rot) Transkript im späten *btl-GAL4; UAS-bnl; 1-eve-1-lacZ* Embryo mit trachealem Reporter. Man erkennt deutlich, dass das *im1*-Transkript in den benachbarten Fettkörperzellen exprimiert wird und nicht im Tracheensystem selbst.

Auch die *in situ*-Hybridisierung anderer von BNL stark transkriptionell aktivierter Gene zeigt sich, dass diese Faktoren fast ausschließlich nicht im Wildtyp, sondern in der Überexpressionssituation exprimiert werden. Dann sind sie auf die dem Tracheensystem benachbarten Zellen des Fettkörpers und des Darms beschränkt, die typische immunaktive Zentren darstellen.

2.4.2 Einige Kandidaten sind spezifisch für das Tracheensystem von *Drosophila*

Durch die bioinformatischen Analysen wurden auch Gene identifiziert, die spezifisch im embryonalen Tracheensystem exprimiert werden und die von BNL abhängig sind. Insbesondere die graphische Aufbereitung der Expressionsdaten durch GO-Cluster, angewendet auf die ImaGO-Annotation der vom *Berkeley Drosophila Genome Project* im Hochdurchsatzverfahren durchgeführten *in situ*-Experimenten, war hierzu sehr hilfreich. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Programm orientiert sich am Ratio logarithmierter Signalintensitäten. Hier weist eine farbkodierte Markierung auf Unterschiede in der Regulation hin, die durch die *in situ*-Hybridisierung bestätigt werden muss.

Bei den nachfolgenden Darstellungen exemplarischer Kandidatengene erfolgt eine Unterscheidung entsprechend ihrer Regulation unter Missexpressionsbedingungen:

- Gene, die durch die Überexpression von BNL transkriptionell aktiviert werden (siehe **Abbildung 37**) und in der Mutanten weniger stark erscheinen.
- Gene, die durch die Überexpression von BNL transkriptionell reprimiert erscheinen, und/oder aber in der Mutanten aktiviert werden (siehe **Abbildung 38**).
- Gene, die im Wildtyp und in der Überexpression gleichermaßen repräsentiert sind, aber in der Mutanten weniger stark aktiviert werden (siehe **Abbildung 39**).

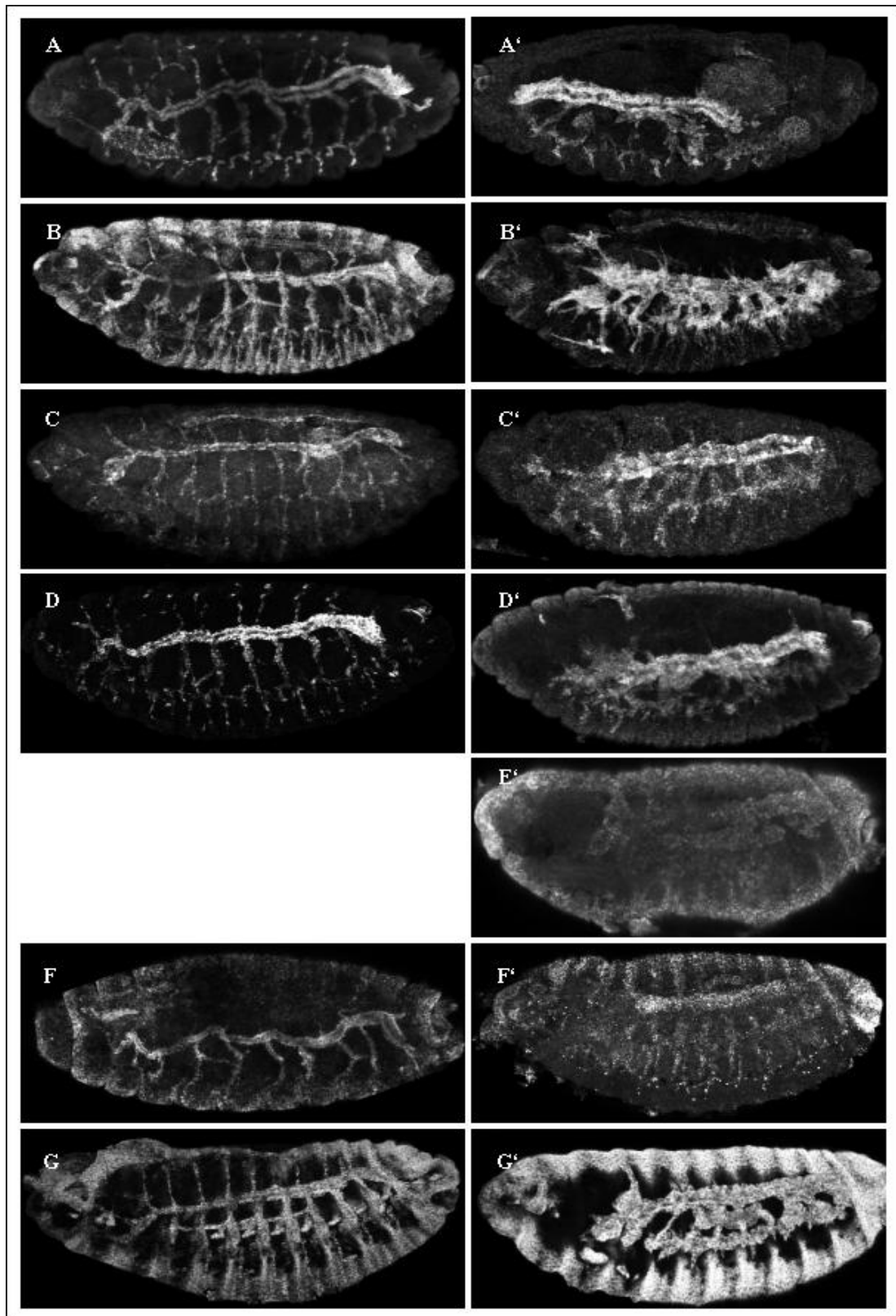


Abbildung 37: Konfokale Projektionen immunhistochemischer Anfärbungen von *antisense*-Sonden nach *in situ*-Hybridisierung. Gezeigt sind Nachweise von Genen, die nach Überexpression von BNL transkriptionell aktiviert erscheinen. Links jeweils ein Wildtypembryo im Stadium 17, rechts der Phänotyp der Überexpression von BNL. Markiert sind die Transkripte von (A) CG32548, (B) CG14622, (C) CG17229, (D) CG15786, (E) CG4089, wobei zu beachten gilt, dass das Transkript im Wildtyp nicht nachgewiesen werden kann, (F) CG8312, und (G) CG4115. Interessanterweise werden einige Gene nicht nur in den Tracheen, sondern auch in anderen epithelialen Zellen des entwickelnden Embryos exprimiert. Besonders deutlich fällt dies bei den Abbildungen (B) und (G) auf.

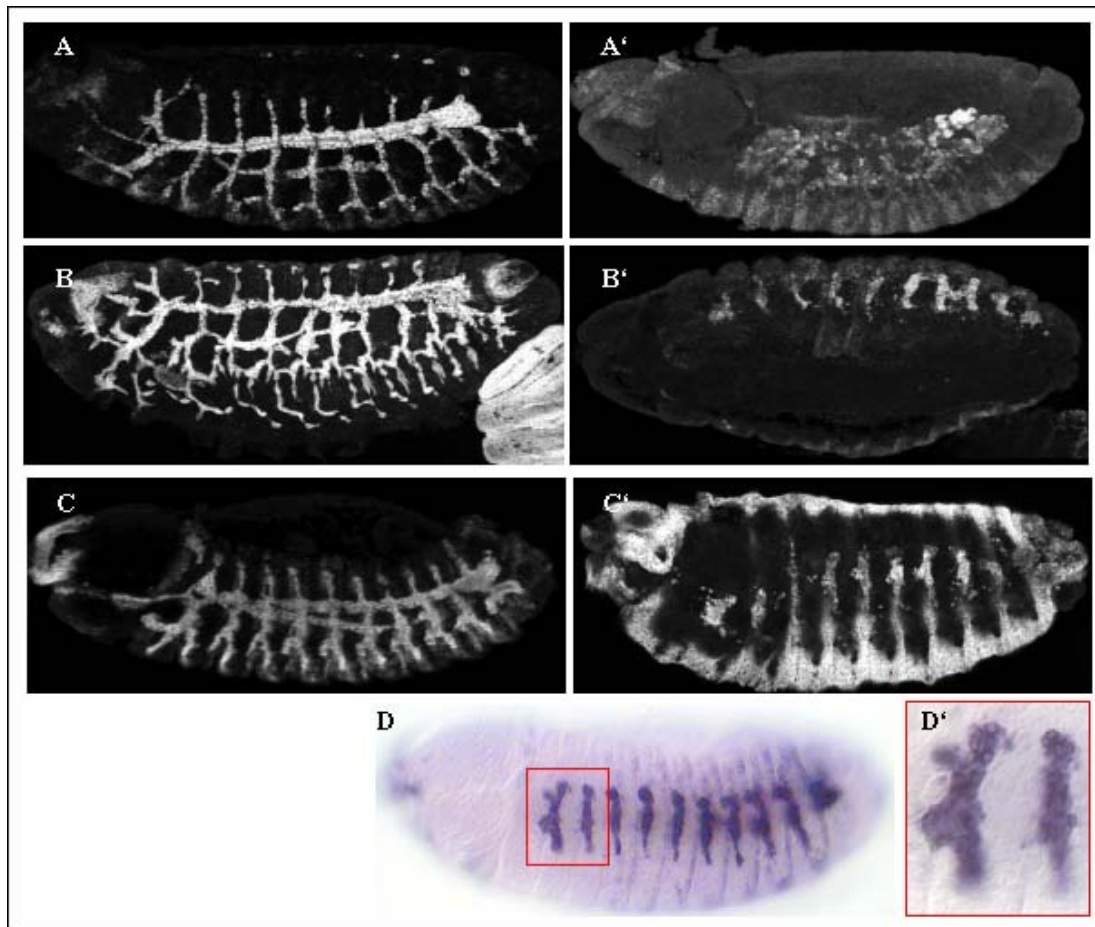


Abbildung 38: Konfokale Projektionen (A bis C) und konventionelle Färbung (D) immunhistochemischer Anfärbungen von *antisense*-Sonden nach *in situ*-Hybridisierung. Gezeigt ist jeweils links ein Wildtypembryo im Stadium 17, und rechts ein *bnl*^{Pl} Embryo mit markierten Transkripten von (A) CG17052, (B) CG32499, und (C) CG32209. Es handelt sich um Gene, die in der Mutanten aktiviert sind. (D) Konventionelle Färbung mit Nitroblautetrazolium für das Transkript von CG32209. Man erkennt hier noch deutlicher die prominente Markierung der nicht migrierenden Tracheenzellen, zwei Tracheensegmente sind im Detail (D') zu sehen.

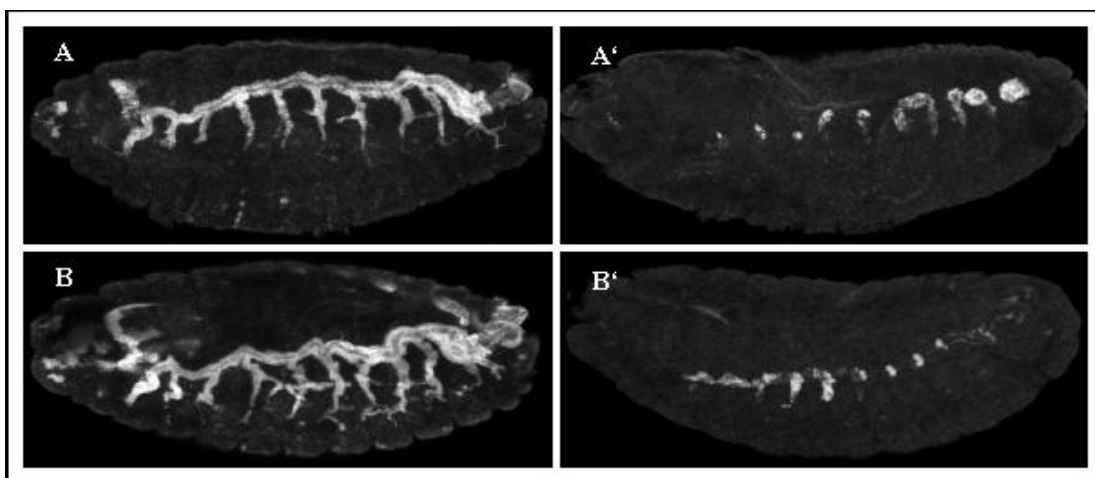


Abbildung 39: Konfokale Projektionen immunhistochemischer Anfärbungen von *antisense*-Sonden nach *in situ*-Hybridisierung. Gezeigt ist links ein Wildtypembryo im Stadium 17 mit markierten Transkripten von (A) CG14356 und (B) CG6457. Diese Gene sind in der Mutanten (B', C') deutlich unterrepräsentiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die durch die bioinformatischen Analysen identifizierten Gene wirklich in den Tracheen exprimiert werden und eine Abhängigkeit von BNL zeigen. Über die tatsächliche Stärke der differentiellen Regulation kann mittels der durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen allerdings keine Aussage getroffen werden. Da das Anliegen der vorliegenden Arbeit einzig die Identifikation und nicht die genaue Charakterisierung differentiell regulierter Gene war, wurde auf quantitative Methoden wie die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion verzichtet.

2.5 Identifikation eines neuen Gens der trachealen Morphogenese durch Kombination von Transkriptomanalyse und einer 2-Hybrid-Untersuchung

Das Homologe des *von Hippel-Lindau*-Tumorsuppressorgens (*vhl*) spielt eine Rolle für die Zellmigration in der Morphogenese des Tracheensystems in *Drosophila* (Adryan et al., 2000). Unabhängig von der funktionell-genomischen Untersuchung der FGF-Signalkaskade wurde im Vorfeld eine 2-Hybrid-Untersuchung an DVHL durchgeführt. Es wurden dabei 71 Hefeklonen identifiziert, die nach Induktion auf Selektionsmedium gewachsen sind. Für 26 von ihnen konnte dieses Wachstum bestätigt werden. Von diesen wuchsen 5 Klone auch auf Glukose-haltigem Medium und benötigten nicht die transkriptionelle Aktivierung des Köderproteins durch Galaktose und Raffinose, weshalb sie als falsch positiv gewertet wurden. Für die verbleibenden 21 Klone wurde Koimmunoprecipitation durchgeführt, und nur 10 von ihnen zeigten das jeweilige Markierungsepitop von Köder und Bibliothek. Zeitgleich standen die Sequenzen für jeden der 26 ursprünglichen Klone bereit für die Identifikation mittels Datenbanksuche bereit (**Tabelle 9**).

Tabelle 9: Übersicht über das Ergebnis der 2-Hybrid-Untersuchung an DVHL. Für jeden der 26 Klone wird die Länge der erhaltenen Sequenz, das dazu homologe Gen mit eventuellem Namen sowie die putative Funktion aufgelistet. Als echte Kandidaten wurden solche ohne Autoaktivierung auf Glukose-haltigem Medium (autoaktiv) und mit positiver Koimmunoprecipitation (Ko-IP) berücksichtigt.

Klon	Länge	Gen	Name des Proteins	Funktion	autoaktiv	Ko-IP
1	434	CG7917	NUCLEOPLASMIN	Nukleosomaufbau	nein	nein
2	184	-	-	-	ja	nein
3	604	CG6954	-	-	ja	nein
4	879	CG7033	-	GroEL-artiger Chaperon	nein	ja
5	572	CG8863	-	DnaJ-artiger Chaperon	nein	ja
6	607	CG1751	-	membrangebundener Signalkomplex	ja	nein
7	562	CG2248	RAC1	kleine GTPase	nein	nein
8	312	-	-	-	nein	nein
9	567	CG8863	-	DnaJ-artiger Chaperon	nein	ja
10	571	CG6621	-	-	nein	ja
11	1123	-	-	-	nein	nein
12	631	CG3569	SPAGHETTI SQASH	nicht-muskuläres Myosin	nein	ja
13	568	CG10944	RIBOSOMAL PROTEIN S6	ribosomale Komponente	nein	nein
14	559	CG7415	DIPEPTIDYL-AMINOPEPTIDASE III	spaltet den Vorläufer von Proctolin	nein	ja
15	569	CG4918	RIBOSOMAL PROTEIN LP2	ribosomale Komponente	nein	nein
16	571	-	-	-	ja	nein
17	233	CG2210	ABNORMAL WING DISCS	Nukleotidkinase	nein	ja

18	228	CG5330	NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1	Histon-spezifischer Chaperon	nein	ja
19	572	CG6905	-	Spleißfaktor	nein	ja
20	575	CG31342	-	-	ja	nein
21	272	CG8409	SUPPRESSOR OF VARIATION 205	Chromatinstrukturierung	nein	nein
22	236	-	-	-	nein	nein
23	253	CG6845	-	-	nein	nein
24	234	CG4027	ACTIN 5C	Komponente des Zytoskeletts	nein	nein
25	229	CG10944	RIBOSOMAL PROTEIN S6	ribosomale Komponente	nein	nein
26	152	CG5468	-	-	nein	ja

Da Chaperone als Helfer der Proteinfaltung häufig in 2-Hybrid-Untersuchungen identifiziert werden und meist aber nichts zum unmittelbaren Wirkmechanismus der betreffenden Proteine beitragen, galten nach diesem Experiment vor allem die Gene *spaghetti squash* (*sqh*), das Gen für DIPEPTIDYL-AMINOPEPTIDASE III (*Dpp III*), das Gen *abnormal wing discs* (*awd*), das Gen für das NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1 (*Nap1*), sowie CG6905 und CG5468 als attraktive Kandidaten zur weiteren Bearbeitung.

Der spätere Abgleich mit den Daten der Transkriptomanalyse zeigte, dass *awd* durch die Überexpression von BNL herunter reguliert wird. Die logarithmierten Signalstärken für das *Probeset* von *awd* fallen im Stadium 14 und Stadium 17 auf -0,38. Unter Hypoxie, wo man von verstärkter Expression von BNL und einer generellen Aktivierung der BNL/BTL-Signalkaskade ausgeht (Jarecki et al., 1999), fällt das Signal sogar auf unter -1,11 im Vergleich zur normoxischen Situation. Konsistent dazu ist die Beobachtung, dass auch bei Überexpression von SIMA das Signal für *awd* auf -0,40 abfällt. Obgleich *awd* ursprünglich als Morphogen in den Imaginalscheiben der Flügel diskutiert wurde (Rosengard et al., 1989), verleitete dies zur Spekulation, dass *awd* im Tracheensystem exprimiert ist und eine Rolle in der Bildung des Tracheensystems spielen könnte.

Eine *in situ*-Hybridisierung mit einer *antisense*-Sonde für *awd* bestätigte die Expression in embryonalen Tracheenzellen (siehe **Abbildung 40 A**). Es ist jedoch zu bemerken, dass der Nachweis des *awd*-Transkripts in den Tracheen bis heute technisch problematisch ist. Verschiedene *antisense*-Sonden markieren das Transkript erst am Ende der Embryogenese, und die Qualität der Färbung deutete zunächst auf einen Färbeartefakt hin. Doch gerade aufgrund der Vielzahl der Hinweise, dass es sich bei *awd* tatsächlich um ein tracheales Gen handeln muss, wurde bei der detaillierten Betrachtung der *awd*-Markierung deren Echtheit bestätigt.

Schließlich wurde aufgrund dieser Hinweise im Labor von Prof. Dr. Tien Hsu an der Medical University of South Carolina, Charleston, USA, ein Antikörper gegen AWD generiert, mit dem das Protein immunhistochemisch eindeutig während der kompletten Tracheogenese in Tracheenzellen nachgewiesen werden kann (siehe **Abbildung 40 B, C**). Dort wurde dann auch die Funktion des Proteins für tracheale Entwicklungsprozesse genauer charakterisiert. Es handelt sich bei AWD um

einen negativen Regulator der BTL/BNL-Signalkaskade, da AWD an der Internalisierung des BTL-Rezeptors nach Bindung von BNL eine Rolle spielt (Dammai et al., 2003).

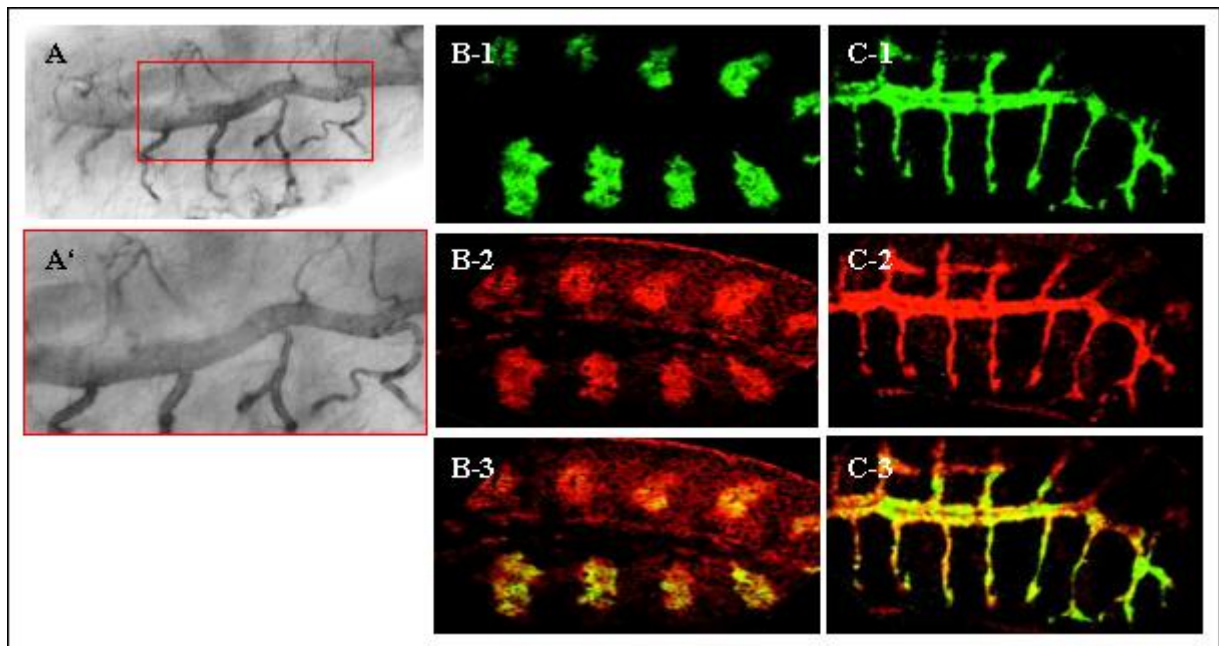


Abbildung 40: Nachweis von (A) *awd*-Transkript und (B, C) AWD-Protein im Tracheensystem. (A) *in situ*-Hybridisierung mit einer *antisense*-Sonde für *awd*. Der immunhistochemische Nachweis der markierten Sonde zeigt erst in späten Embryonen ab Stadium 16 eine Färbung in den Tracheen, die zunächst nach einem Färbeartefakt aussieht. Bei der Betrachtung einer (A') **Detailaufnahme** erkennt man an der Aussparung der Zellkerne, dass es sich tatsächlich um eine reelle Färbung handelt. **Immunhistochemischer Nachweis von AWD (B) im frühen Tracheensystem des Stadiums 12 und (C) im Stadium 15.** Im grünen Kanal (1) erkennt man die Markierung der trachealen Reporter-β-Galaktosidase, um roten Kanal (2) die Markierung von Awd. Die Überlagerung (3) belegt eindeutig die Koexpression in den Tracheenzellen.

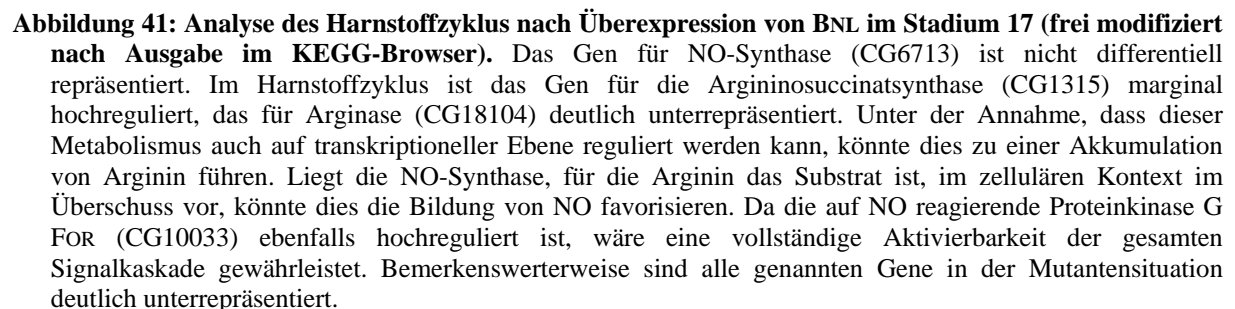
2.6 Die Aktivierung der Stickstoffmonoxid-Signalkaskade durch *BRANCHLESS* konnte nicht bestätigt werden

Die nach der Überexpression von BNL am deutlichsten überrepräsentierten Gene sind solche, die putativ in der angeborenen Immunabwehr von *Drosophila* eine Rolle spielen. Interessanterweise werden diese im Fettkörper aktiviert, der in unmittelbarer Nachbarschaft zum Tracheensystem liegt, nicht aber in den trachealen Zellen selbst. Da der Fettkörper nicht den spezifischen Rezeptor BTL exprimiert, scheidet eine direkte Aktivierung der Immungene direkt durch BNL aus. Es müssen daher andere Botenstoffe existieren, die, über die Tracheen vermittelt, eine ektopische Immunantwort auslösen.

Als ein attraktiver Kandidat erschien das Stickstoffmonoxid-Radikal NO. Eine Reihe von Gründen sei hierfür angeführt:

- (a) NO vermittelt eine Immunantwort im Fettkörper durch gesteigerte Aktivität der NO-Synthase in Zellen des Darms, wenn Larven bakteriell kontaminiertes Futter zu sich nehmen (Foley und O'Farrell, 2003).

- Die Genexpressionsanalyse zeigte zwar keine differentielle Repräsentierung des Gens für NO-Synthase, jedoch deutete die Analyse mit dem KEGG-Browser an, dass eine Bildung von NO unter der Überexpressionssituation von BNL favorisiert sein könnte (siehe **Abbildung 41**).



75

Immunabwehr im Darm zur ektopischen Aktivierung der Immunantwort im Fettkörper führen. Die *in situ*-Hybridisierung zeigte deutlich, dass *for* bereits im embryonalen Tracheensystem exprimiert wird.

NO- und NO-Synthase-Nachweis in Tieren. Zunächst wurde versucht, die Hypothese durch direkten Nachweis des NO-Radikals zu bestätigen. Da NO hochreaktiv ist und seine Lebensdauer deutlich < 5 s liegt, scheidet ein Nachweis an fixiertem Material aus. Für einen *in vivo*-Nachweis wurde der spezifische und NO-reaktive Fluoreszenzfarbstoff 4,5-Diaminofluorescein (DAF) eingesetzt. Um den Farbstoff in die Embryonen einzubringen, wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurde die Vitellinmembran durch Lösungsmittel chemisch permeabilisiert und die Embryonen in ein Färbebad gebracht. Des weiteren wurde versucht, den Farbstoff durch Injektion in die Körperhöhle einzubringen. Beide Verfahren scheiterten daran, dass entweder gar keine Färbung erfolgte oder dass an den Eintrittswunden von Lösungsmitteln oder Injektionsnadeln ein NO-Signal zu sehen war, das die genauere Dokumentation eventueller weiterer Signale im Inneren der Tiere verhinderte (Daten nicht gezeigt).

Ein photometrischer Nachweis der NO-Zerfallsprodukte Nitrit und Nitrat mit dem Griess'schen Reagenz in Embryonenlysat scheiterte an der Tatsache, dass für die eingesetzten Embryonzahlen (bis zu 500 in 100 μ l PBS) unter allen getesteten genetischen Bedingungen keinerlei Farbreaktion einsetzte. Eine Erhöhung der Embryonenzahl war nicht dienlich, da der Anteil an absorbierenden Schwebstoffen stark zunahm (Daten nicht gezeigt).

Der biophysikalische Nachweis für NO kann mittels der Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie) geführt werden. Hierfür wurden am Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen entsprechende Untersuchungen vorgenommen (siehe **Abbildung 42**).

Es wurden mit der ESR-Spektroskopie Signale für Embryonen in der Überexpression von BNL im Stadium 17 gemessen, die eventuell dem NO-Radikal, theoretisch aber auch jedem anderen Radikal mit einem g-Wert von 2,0023 entsprechen können. Eine eindeutige Klärung scheitert an der Signalstärke (Dr. Claudia Stückel, persönliche Mitteilung). Man erkennt jedoch, dass die Intensität und die Ausprägung des Sattelpunktes bei 3360 G ausgeprägter als im Wildtyp ist. Eine präzise Quantifizierung ist nicht möglich. Um die Einflüsse des genetischen GAL4-Hintergrundes zu evaluieren, wurde eine weitere Überexpression mit einem tracheal Gen, *btl*-GAL4; UAS-*mega*, getestet. Interessanterweise ist das Signal in diesem Falle deutlich stärker und ausgeprägter als für die Überexpression von BNL. Dies spricht dafür, dass unter Überexpressionsbedingungen im Allgemeinen die Bildung von NO oder anderen Radikalen zunimmt.

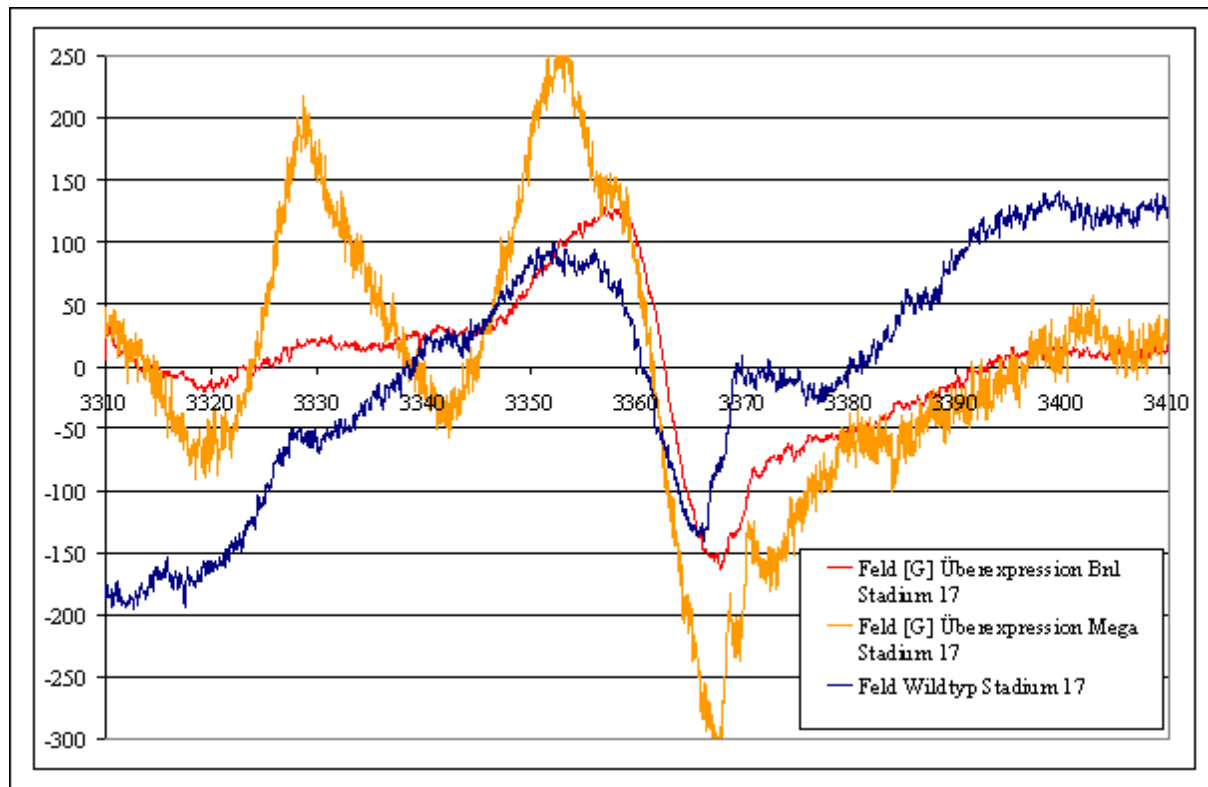


Abbildung 42: ESR-Spektren für die Genotypen *btl-GAL4; UAS-bnl*, *btl-GAL4; UAS-mega* und Wildtyp *Ore R*. Aufgetragen ist die Signalintensität gegen die Magnetfeldstärke. Die Spektren sind nicht auf den Landé-Faktor g geeicht. In dieser Abbildung erwartet man im Bereich um etwa 3360 G das Signal radikalischer Signale. Die Größenordnung der gewonnenen Intensitäten läßt keine Zuordnung zum NO-Radikal zu.

Da der Nachweis des NO-Radikales im lebendigen Embryo nicht etabliert werden konnte, wurde versucht, in frisch präparierten Material die NADPH-Diaphorase von NO-Synthase sichtbar zu machen. Diese Aktivitätsfärbung bestätigte die Expression des Enzyms im Zentralnervensystem, was in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der *in situ*-Hybridisierung für das NO-Synthase-Gen ist (Daten nicht gezeigt). Eine Expression und Aktivität des Enzyms im Tracheensystem oder umliegenden Gewebe konnte nicht festgestellt werden.

Genetische Versuche zur Hypothese der NO-Signalisierung im Tracheensystem. Die Gene für NO-Synthase, Argininosuccinatesynthase und Arginase konnten durch *in situ*-Hybridisierung nicht spezifisch im Tracheensystem detektiert werden. Allerdings erscheinen ubiquitäre Signale, die geringfügig stärker als Hintergrundsignale sind (Daten nicht gezeigt). Im Falle der Argininosuccinatsynthase und der Arginase wurde vermutet, dass ihre differentielle Expression unter Überexpressionsbedingungen zu schwach ist, als dass sie mit der *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden könnte, jedoch der Grad der transkriptionellen Regulation für eine biologische Wirkung durchaus ausreichend sein könnte. Zunächst sollte daher gezeigt werden, dass das NO-Radikal bereits im Embryo eine morphogenetische Wirkung auf das Tracheensystem haben kann. Der tracheale Phänotyp nach ubiquitärer Expression einer NO-Synthase aus Maus wurde in Larven bereits

beschrieben (Wingrove und O'Farrell, 1999). Die genaue Charakterisierung von organspezifischer Überexpression mit der endogenen NO-Synthase in den Tracheen mittels *btl*-GAL4; UAS-*NO-Synthase* wurde daher auch auf die larvalen Stadien ausgedehnt.

Für beide Altersbedingungen zeigt sich, dass das NO-Radikal als Botenstoff der Tracheogenese dienen kann, da das tracheale Erscheinungsbild nach Überexpression des Gens der NO-Synthase alteriert ist (siehe **Abbildung 43**). Embryonal erkennt man, dass die Gesamtstruktur des Tracheensystems oftmals gestört ist. In wie weit der larvale Phänotyp aus diesem embryonalen hervorgeht, kann nicht beurteilt werden. Noch häufiger erkennt man, dass sich vom dorsalen Hauptstamm ausgehend feine Ausläufer bilden, die, an Position der dorsalen Äste, lang und ausgestreckt auswachsen. Hier erkennt man auch in Larven einen deutlichen Phänotyp. Während im Wildtyp an den dorsalen Anastomosen jeweils zwei Terminalzellen einige in ihrer Organisation einfache Verzweigungen zeigen, sind diese nach Überexpression des NO-Synthasegens deutlich mehr und in ihrer Struktur und Organisation komplexer. Die Anzahl der terminalen Verzweigungen nimmt zu.

Auch die NO-abhängige Proteinkinase FOR wurde genetisch durch Überexpression in den Tracheen auf einen Phänotyp hin untersucht (siehe **Abbildung 44**). Embryonal zeigen sich eine Reihe von Parallelen zum Überexpressionsphänotyp von BNL, wenn auch in deutlich milderer Ausprägung. So zeigen vor allem die Äste der Schlundtracheen und die Viszeraläste ektopische Verzweigungen. Parallel zum Überexpressionsphänotyp von NO-Synthase kann man an den Terminalzellen der dorsalen Äste erkennen, dass ektopische Verzweigungen gebildet werden, die sich teilweise überkreuzen.

Die erhaltenen Ergebnisse müssen sehr vorsichtig interpretiert werden. Zwar wird *for* nach *in situ*-Befund embryonal in den Tracheen exprimiert und es zeigt sich in der Überexpressionssituation ein Phänotyp, umgekehrt sind aber in der Mutantensituation für FOR keine auffälligen trachealen Effekte zu beobachten (Daten nicht gezeigt), wie sie zum Beispiel in der Larve zu sehen sind (Wingrove und O'Farrell, 1999). Möglicherweise treten Defekte aber tatsächlich erst später auf, da für die larvale Mutante eine deutlich geringere Anzahl an terminalen Verzweigungen beschrieben wird, die erst larval entstehen. Interessanterweise verfügt FOR in der Überexpression über das Potential, in Terminalzellen neue Verzweigungen zu induzieren. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors SRF hingegen, welcher der molekulare Marker für Terminalzellen ist, führt nur zur Elongation der terminalen Verzweigungen (Daten nicht gezeigt).

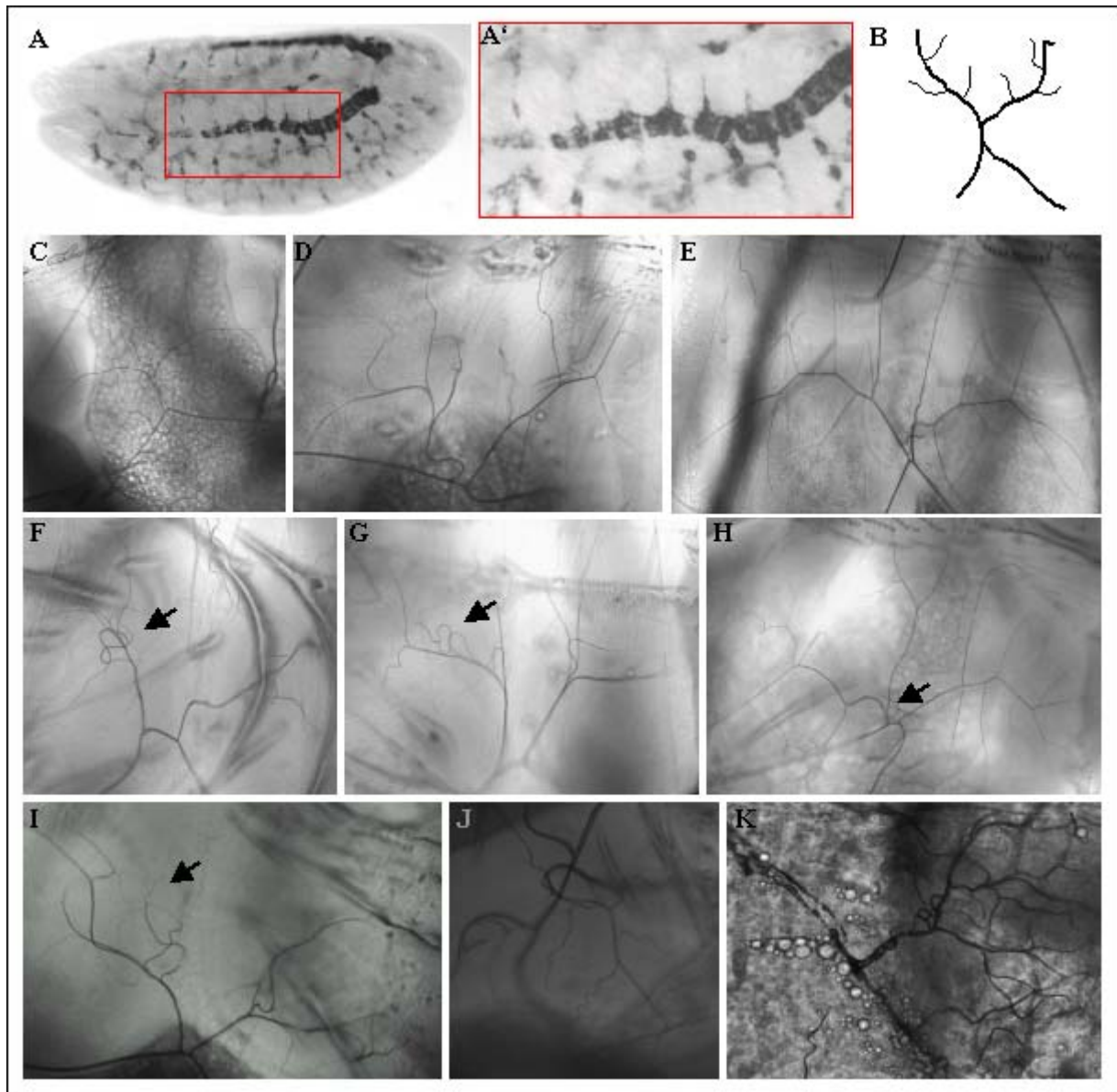


Abbildung 43: Die Überexpression von NO-Synthase im Tracheensystem. (A) Embryonaler Phänotyp mit (A') Detail. Anfärbt sind die Zellen durch *in situ*-Hybridisierung mit einer Antisense-Sonde für das Gen der NO-Synthase. Man erkennt die gestörte Gesamtstruktur des Tracheensystems. Auffällig sind vor allem die langgestreckten Zellausläufer, die vom dorsalen Hauptstamm ausgehen. **(B) Schematische Darstellung dorsaler terminaler Zellen in Larven.** Segmental geht von den dorsalen Hauptstämmen jeweils ein dorsaler Ast ab, der sich in der Medianebene mit seinem Gegenüber zu einer H-förmigen Struktur zusammenlagert. An den Anastomosen sitzt je eine Terminalzelle, von denen sich anterior eine Vielzahl kleinerer Terminaläste abspaltet. **(C bis E) Wildtypische dorsale Äste mit Terminalzellen.** Exemplarisch sind drei verschiedene dorsale Äste im Durchlicht gezeigt. Man erkennt jeweils die Anastomose und die Verzweigungen der terminalen Äste, die sich in einfach strukturierter Aufspaltung ausbreiten. **(F bis K) Dorsale Äste in der Überexpression von NO-Synthase.** Auffällige Strukturen sind mit Pfeilspitzen verdeutlicht. **(F und G)** Eine Schlingelung und gegenseitige Überkreuzung terminaler Äste kann im Wildtyp nicht beobachtet werden. **(H)** Die erste Verzweigung der Terminalzelle geschieht direkt auf Höhe der Anastomose. Im Wildtyp liegen Anastomose und erste Verzweigung deutlich weiter auseinander. **(I)** Eine Vielzahl feiner Verzweigungen gehen von sekundären Ästen ab. Dies ist in der Wildtypesituation eher selten. **(J und K)** Es existieren Kombinationen aus gegenseitigem Überkreuzen und einer Vielzahl an Verzweigungen.

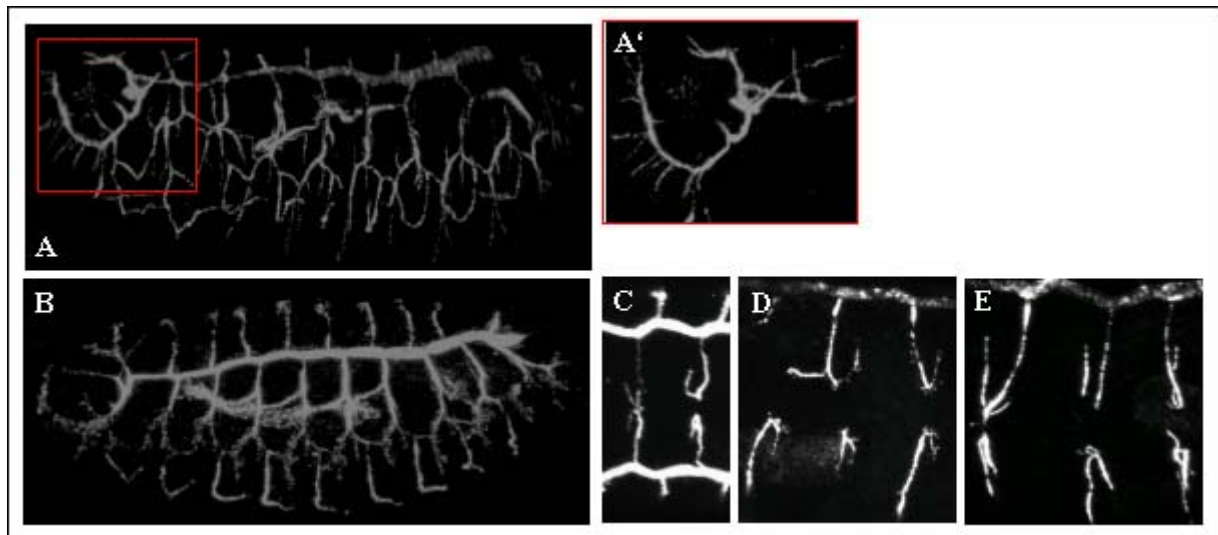


Abbildung 44: Embryonale Phänotypen nach Überexpression der NO-abhängigen Proteinkinase FOR. (A und B) Laterale konfokale Projektionen von *btl-GAL4; UAS-for* Embryonen im Stadium 17 nach immunhistochemischer Anfärbung mit dem lumenspezifischen Antikörper 2A12. Es sind Gemeinsamkeiten mit dem Phänotypen der Überexpression von BNL festzustellen. In (A) und dem Detail (A') erkennt man eine Vielzahl an Verzweigungen der Schlundtracheen. Diese tracheale Äste zeigt auch nach Überexpression von BNL eine empfindliche Reaktion auf den Botenstoff, die so in der Wildtypsituation nicht zu beobachten ist. (B) Wie häufig nach Überexpression von BNL beobachtet, zeigen die von den Transversverbindungen nach Innen abgehenden viszerale Äste eine lampenbürstenartige Erscheinung. (C bis E) Dorsale Äste und Anastomosenbildung im Wildtyp und nach Überexpression von FOR. Dorsale konfokale Projektionen nach Anfärbung mit 2A12. (C) **Wildtyp.** Man erkennt die dorsalen Äste von zwei Segmenten. Im anterior gelegenen Segment hat die Anastomosenbildung schon stattgefunden. Die bereits gebildeten Terminalzellen an den prospektiven Kontaktpunkten spalten genau einen terminalen Ast nach anterior ab. (D und E) **Überexpression von FOR.** Im Unterschied zum Wildtyp gehen von den terminalen Zellen teilweise mehr als nur eine Verzweigung ab. Diese gehen auch nach posterior ab, es kommt zu Überkreuzungen einzelner Terminaläste.

Da der Phänotyp der NO-abhängigen Kinase FOR in der Überexpression dem von BNL ähnelt, das Radikal aber nicht nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, den putativ entstehenden Botenstoff durch einen genetischen-biophysikalischen Trick abzufangen. Die Expressionsdaten zeigen, dass das Gen für das Globinprotein in *Drosophila* unter Hypoxie (-0,71) und nach Überexpression von SIMA (-0,35 im Stadium 14, -0,20 im Stadium 17) herunterreguliert ist. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Tomas Hankeln, Institut für Genetik, Universität Mainz, wurden dort Hinweise gefunden, dass Globin unter hyperoxischen Bedingungen (bei ca. 30% O₂) zum Abfangen von Sauerstoffradikalen dient. Da die Affinität des NO-Radikals zu fünffach koordinierten Eisenzentren wie im Globinprotein um ein Vielfaches höher sein sollte als die von Sauerstoff (Atkins und de Paula, 2001), sollte es theoretisch möglich sein, durch Überexpression von Globin die Komplexbildung des NO in einen Nitrosylkomplex an Eisen zu favorisieren.

Tatsächlich wurden unter den *btl-GAL4; UAS-bnl; UAS-globin* Embryonen einige Tiere gefunden, die einen milderen als den bekannten Überexpressionsphänotyp von Bnl zeigen (siehe **Abbildung 45**). Auch die tracheenspezifische Expression eines RNA-Interferenz-Konstrukts gegen die Häm-bindende Domäne der NO-Synthase (*btl-GAL4; UAS-nos^{RNAi}*) zeigt einen trachealen Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Allerdings sind in diesen Embryonen hauptsächlich primäre und sekundäre Tracheenäste

betroffen, entgegen den Erwartungen, dass die Anzahl und die Art terminaler Verzweigungen verändert sein sollte. Möglicherweise handelt es sich dabei auch um unspezifische Effekte der RNA-Interferenz.

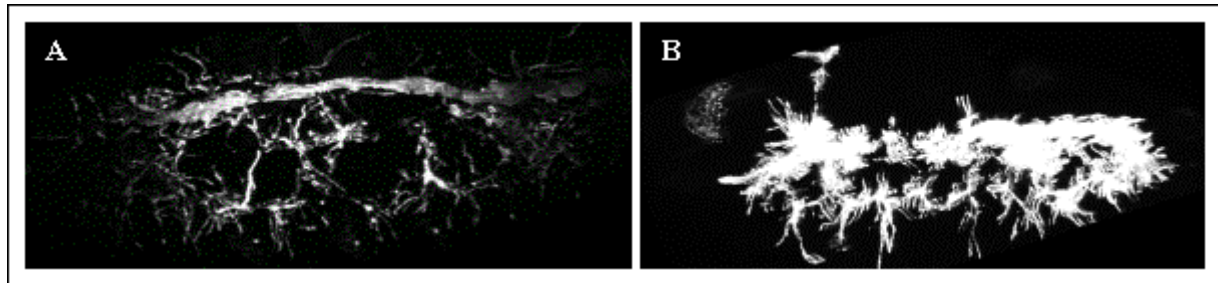


Abbildung 45: Einige *btl*-GAL4; UAS-*bnl*; UAS-*globin* Embryonen zeigen einen weniger verzweigten trachealen Phänotyp (A) als Tiere in der Überexpression von BNL (B) alleine. Beide laterale konfokale Projektionen sind Lumenfärbungen. Es fällt auf, dass in (A) deutlich weniger Verzweigungen gebildet werden als in der exklusiven Überexpression von BNL.

Wenn eine genetische Abhängigkeit von BNL und NO-Signalkaskade tatsächlich besteht, so ist zu erwarten, dass auch die Aktivierung durch einen konstitutiv-aktiven BTL-Rezeptor in den Tracheen zur Bildung der Immunfaktoren im Fettkörper beiträgt. Es wäre weiterhin zu erwarten, dass nicht der freie Ligand BNL, sondern tatsächlich die tracheengebundene Signalkaskade für diesen Effekt verantwortlich ist. Tatsächlich zeigen auch Embryonen mit konstitutiv aktivem Rezeptor (*btl*-GAL4; UAS-*btl*^{aktiviert}) eine starke Expression von Immunfaktoren im Fettkörper (Daten nicht gezeigt). Da im spektroskopischen Nachweis auch für *btl*-GAL4; UAS-*mega* Embryonen die Anwesenheit von Radikalen und somit putativ von NO gezeigt werden kann, wurde auf Expression von Immunfaktoren hin überprüft. Auch hier erhält man ein Signal im Fettkörper (Daten nicht gezeigt), was unter Annahme einer genetischen Unabhängigkeit von MEGA und BNL zur Annahme verleiten kann, dass die Auslösung der Immunkaskade entweder vom GAL4-System selbst oder von der trachealen Missbildung ausgeht. Die Überexpression von MEGA im Darm mittels G445-GAL4-Treiber resultiert nicht in der Expression der Immungene (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise zeigen Embryonen in der Überexpressionssituation von NO-Synthase keine Aktivierung der Immungene im Fettkörper (Daten nicht gezeigt), so dass die ursprüngliche Hypothese verworfen werden muss.

Überaktivierung von BREATHLESS in Zellkultur. Ermutigt von der Tatsache, dass die Überaktivierung der NO-Synthase durch das GAL4-UAS-System im späten Embryo und in Larven zu einem milden trachealen Phänotyp führt, wurde parallel zu den genetischen Experimenten mittels Zellkultur versucht, einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von BNL und dem NO-Signalweg aufzuzeigen. Zwei Umstände förderten dieses Vorhaben: DAF wurde ursprünglich für den NO-Nachweis in kultivierten Zellen etabliert, und Überexpressionskonstrukte für den konstitutiv-

aktiven BTL-Rezeptor und DOF (Petit et al., 2004) standen zur Verfügung. Es konnten NO-abhängige Färbungen detektiert werden, die allerdings nicht für die Überexpressionssituation spezifisch waren, sondern im allgemeinen in sich gerade teilenden Zellen beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Fazit. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass (a) die NO-abhängige Proteinkinase FOR im Tracheensystem exprimiert wird, (b) die Überexpression einzelner Komponenten (NO-Synthase, FOR) des hypothetischen NO-Signalwegs tracheale Phänotypen verursacht, aber nicht ausreichend ist für die Aktivierung der Immungene im Fettkörper, und (c) die NO-Signalkaskade unabhängig von BNL ist.

3 Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Resultate sollen an dieser Stelle nunmehr experimentübergreifend und im Kontext publizierten Daten und wissenschaftlicher Literatur dargestellt werden, insbesondere im Hinblick auf die Neuheit der Ergebnisse.

3.1 **Durch Überexpression von *BRANCHLESS* differenzieren fast alle Zellen des Tracheensystems zu Terminalzellen**

Das Tracheensystem von Embryonen verschiedener *bnl*-Genotypen (Wildtyp, Mutante *bnl^{P1}* und Überexpression im Tracheensystem in *btl*-GAL4; UAS-*bnl* Embryonen) wurde an lebendigem und fixiertem Material morphologisch untersucht.

Die Wildtypsituation und die Charakteristika der Mutanten wurden bereits eingehend beschrieben (Sutherland et al., 1996; Ribeiro et al., 2002), und die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Betrachtungen sind in Übereinstimmung mit der Literatur. Neu ist die detaillierte Analyse der Überexpressionssituation. Mittels der konfokalen Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass durch ektopische Dosen von BNL aus dem Tracheensystem eine Vielzahl sehr dünner und langer tubulärer Ausläufer bis tief ins Viszerum des sich entwickelnden Embryos aussprossen. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass das wildtypische BNL-Signal von ektopischem BNL überlagert wird und grundlegende Richtungsinformationen verloren gehen. Im Wildtyp tritt eine solche Anatomie niemals auf, das Tracheensystem bildet hier eine dorso-lateral zentrierte Spange um das Viszerum (Manning und Krasnow, 1993). Der Verlauf der alterierten Tracheogenese konnte nicht detailliert aufgeklärt werden. Eine zeitaufgelöste Analyse über den gesamten Zeitraum der Tracheenbildung im lebenden Tier schied wegen der technischen Schwierigkeit aus, dass die Tracheen während der Embryogenese mehrfach ihre Tiefenlage verändern und somit nicht im selben Tier verfolgt werden können. An fixiertem Material erkennt man jedoch, dass in mittleren Stadien der Tracheogenese (etwa Stadium 15) das grundsätzliche Bauprinzip im Vergleich zum Wildtyp noch erhalten ist, jedoch von den primären Tracheenästen bereits eine Vielzahl kleinster Verzweigungen aussprossen. Offensichtlich ist auch, dass beginnend mit dem Stadium 16 insbesondere die Schlundtracheen auf das ektopische BNL-Signal reagieren und sich das Tracheensystem derart anomal entwickelt, dass das wildtypische stereotype Bauprinzip verloren geht. Dennoch kann die unterschiedlich starke Ausprägung zweier trachealer Überexpressionsphänotypen im Stadium 17 nur unzureichend erklärt werden. Im milderen Phänotyp ist neben dem Verlauf des dorsalen Hauptstammes, der weitgehend unabhängig von BNL seine Richtungsinformationen erhält (Wolf und Schuh, 2000; Wolf et al., 2002), auch noch der laterale Hauptstamm erhalten. Dieser geht im stärkeren Phänotyp verloren. Beiden späten Phänotypen ist aber gemein, dass sie über eine Vielzahl sehr langer trachealer Ausläufer verfügen, die an Länge und Verzweigungsgrad an tracheale Zellen mit terminaler Identität erinnern.

Die Tatsache, dass die ektopische Expression von BNL die Entstehung von Terminalzellen induziert, ist ohne weitergehende Charakterisierung publiziert (Sutherland et al., 1996). Für die vorliegende Arbeit wurde die Kinetik dieser ektopischen Induktion betrachtet. Durch die computergestützte Auszählung von Zellen, die mittels eines molekularen Markers auf die tracheale Identität hin untersucht wurden, konnte bestimmt werden, dass bereits im Stadium 15 mehr als doppelt so viele Zellen die Terminalzellidentität haben als im Stadium 17 des Wildtyps. Gegen Ende der Embryogenese haben sich in der Überexpressionssituation sogar fast 90% aller Tracheenzellen in putative Terminalzellen umdifferenziert. Die Datenermittlung ist in sich schlüssig, da die manuelle Auszählung von Terminalzellen im Stadium 17 des Wildtyps etwa 150 Zellen ergab (Affolter et al., 1994a), im Vergleich zu 160 Zellen, die für die vorliegende Arbeit ermittelt wurden. Vergleicht man diese Daten mit Zellzählungen und Schätzungen anderer Autoren (Samakovlis et al., 1996a), so erkennt man, dass beispielsweise von den etwa 400 Zellen des dorsalen Hauptstammes oder von den etwa 200 Fusionszellen, welche die ordnungsgemäße Verbindung zwischen trachealen Metameren vermitteln sollen, sehr viele ihre ursprüngliche Identität verloren haben müssen.

Die vorliegenden Daten lassen also darauf schließen, dass es sich um die Umdifferenzierung von verschiedenen trachealen Zellidentitäten in Terminalzellidentität handelt und nicht nur um eine Reaktion von undifferenzierten Zellen, die BNL als permissives Signal benötigen. Allerdings scheint es Kompetenzgruppen zu geben, die besonders responsiv auf BNL reagieren. So gehören auch zu den meisten milden Überexpressionsphänotypen extrem lange Ausläufer der Schlundtracheen und der viszerale Tracheenäste. Beide Äste versorgen im Wildtyp diejenigen Organe, die ausgesprochen kritisch von der Verfügbarkeit von Sauerstoff abhängig sind, nämlich das Gehirn, die Schlundmuskulatur und den Darm. Da das Tracheensystem unter hypoxischen Bedingungen durch eine BNL-abhängige Plastizität gekennzeichnet ist (Jarecki et al., 1999), wäre es vorstellbar, dass die sekundären Äste dieser Gewebe einfacher umdifferenziert werden können als beispielsweise die primären Äste.

3.2 Die in den Missexpressionssituationen auftretende Letalität in den frühen Larvalstadien könnte Resultat einer fehlenden Sauerstoffversorgung des Gewebes sein

Die Missexpression von BNL wirkt sich ungünstig auf die Entwicklungsfähigkeit von *Drosophila* aus. Es ist bekannt, dass Tiere des mutanten Genotyps *bnl^{P1}* in den Larvenstadien sterben (Sutherland et al., 1996). Zusätzlich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die Überexpression von BNL semi-letal ist. Der Großteil der Tiere in der Überexpression stirbt im ersten Larvenstadium, das mit fünf Tagen deutlich länger ist als das etwa 24stündige im Wildtyp. Auch ist auffällig, dass sich die Larven extrem langsam bis hin zur Bewegungsunfähigkeit bewegen. Zwei Gründe können hierfür in betracht gezogen werden und wurden experimentell überprüft:

- (1) Der FGF-Rezeptor BTL wird auch in den Glia der Mittellinie exprimiert (Klamt et al., 1992), und eine Überexpression des Liganden BNL könnte Defekte des Zentralnervensystems zur Folge haben. Dies ist ein attraktives Modell zur Erklärung der prämortalen Bewegungsunfähigkeit. Allerdings zeigt die experimentelle Überprüfung mittels immunhistochemischer Anfärbung des Nervensystems keinen auffälligen Befund.
- (2) Die Tiere gehen durch ein funktionsunfähiges Tracheensystem spätestens während der Larvenstadien eine enorme Sauerstoffschuld ein, die letztlich zum Tod der normalerweise motorisch sehr aktiven Larven führt. In der Überexpression entsteht zwar ein morphologisch komplexes Tracheensystem, welches aber physiologisch keinen Nutzen hat, da die späte embryonale Gasfüllung ausbleibt. Der Grund hierfür könnte in der deutlichen Missregulation vieler Signalkaskaden liegen, wie sie durch die Transkriptomanalyse angedeutet wird, da die Gasfüllung kritisch von genetischer Regulation abhängig ist (Liu et al., 2003). Dies konnte entwicklungsphysiologisch nachwiesen werden, in dem in Zusammenarbeit mit Dr. Ralph Pirow vom Institut für Zoophysiologie der Universität Münster eine Methodik zur *in vivo*-Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks im Wasserfloh *Daphnia* (Pirow et al., 2004) erstmals für das landlebende Insekt *Drosophila* angepasst wurde. Es zeigt sich, dass späte Embryonen in der Überexpressionssituation einen 5-10 mmHg niedrigeren endogenen Sauerstoffpartialdruck haben als wildtypische Vergleichstiere mit Gasfüllung. Übereinstimmend mit eigenen und publizierten Beobachtungen (Kloek, 1979; Frazier et al., 2001) sind Larven, die unter geringen Sauerstoffkonzentrationen < 10% gehalten werden, ebenfalls lokomotorisch eingeschränkt und verbleiben deutlich länger als einen Tag im ersten Larvenstadium. Auch wenn die Anzahl der bis zum Adult entwickelten Tiere in Überexpressionssituation zu gering für verallgemeinernde Aussagen ist, gilt zu erwähnen, dass diese ausschließlich männlich waren. Auf Ebene der Transkriptomanalyse kann dies zum Teil nachvollzogen werden, da eine Reihe geschlechtsspezifischer Gene (die beispielsweise für die Proteine MOF, MSL-3, RETN und TWE kodieren) transkriptionell aktiviert erscheinen.

Unter Betrachtung der ermittelten Daten erscheint demnach das zweite Modell als der wahrscheinlicherer Grund für die larvale Letalität, in beiden Missexpressionssituationen. In der Mutanten wird kein tracheales Netzwerk erstellt, und in der Überexpression ist es physiologisch inaktiv. Daher müssen auch eventuelle Seiteneffekte der endogenen Hypoxie für die weiteren Analysen im embryonalen Stadium 17 beachtet werden. Es ist denkbar, dass eine Reihe der Kandidaten mit putativ enzymatischer Funktion nur deshalb in der Überexpression aktiviert werden, da sie zur Selbsterhaltung der Zelle unter Sauerstoffmangel beitragen, wie beispielsweise die Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Auch die Aktivierung zusätzlicher Signalkaskaden könnte durch die endogene Hypoxie begründet sein.

3.3 Die Transkriptomanalyse verschiedener *bnl*-Genotypen liefert kontrovers zu interpretierende Daten

Die Transkriptomanalyse ist in Kombination mit dem vollständig sequenzierten Genom ein wichtiges, bewährtes Werkzeug in der Erforschung der Biologie von *Drosophila*. Richtungsweisende Experimente waren die Erstellung einer lückenlosen zeitlich hochaufgelösten Aktivitätskarte für entwicklungsrelevante Gene (Arbeitman et al., 2002), die Betrachtung der Genaktivität unter verschiedenen physiologischen Voraussetzungen wie Krankheit (De Gregorio et al., 2001; Irving et al., 2001; Boutros et al., 2002), Hunger (Pletcher et al., 2002) und Hitze (Leemans et al., 2000) oder unter zeitlichen Bedingungen wie Alter (Zou et al., 2000; Pletcher et al., 2002; Landis et al., 2004) oder Tageszeit (Ueda et al., 2002). Für die vorliegende Arbeit zum Teil als Vorbild dienend waren insbesondere entwicklungsbiologisch interessante Experimente, beispielsweise die Transkriptomanalysen nach Überexpression von Transkriptionsfaktoren (Egger et al., 2002; Montalita-He et al., 2002). Besonders die transkriptionelle Gegenüberstellung genetisch dorsalisierter und ventralisierter Embryonen (Stathopoulos et al., 2002) zeigte unmittelbare Relevanz, wurden aufgrund dieser Studie doch die beiden neuen FGF-Faktoren PYR und THS identifiziert (Stathopoulos et al., 2004). Doch nicht immer führen Transkriptomanalysen zu derart spektakulären Ergebnissen.

3.3.1 Grenzen der Technik und Limitationen durch experimentelles Design

Der Erfolg der bereits publizierten Studien kann nicht darüber hinwegtäuschen, dass die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen auf den ersten Blick und bei oberflächlicher Betrachtung nicht ganz so erfolgreich erscheinen:

- (1) Die statistisch immer wieder auffälligen und am eindrucksvollsten regulierten Gene haben hauptsächlich eine putative Immunfunktion, werden nicht tracheal sondern im Fettkörper exprimiert und sind womöglich Artefakte der ektopischen Überexpression (siehe 3.5).
- (2) Bekannte tracheale Gene, als putative Ziele der BNL-Signalkaskade diskutierte Gene sowie das *Probeset* für *bnl* selbst zeigen keinen statistisch auffälligen Befund.

Deshalb sollen an dieser Stelle eine Reihe von Limitationen zusammengefasst werden, die sich kritisch auf den Erfolg von Transkriptomanalysen im Allgemeinen und im Besonderen auswirken:

Der systematische Fehler, der bei allen Transkriptomanalysen gleichermaßen auftritt: Die zahlenmäßige Bestimmung des Expressionswerts zur relativen Quantifizierung von genetischer Aktivität ist ein technisch hochkomplexes Unterfangen, das von einer beinahe unüberschaubaren Menge an Parametern abhängt. Dies beginnt mit der Qualität der eingesetzten RNA, wird fortgesetzt mit Effizienz der unterschiedlichen enzymatischen Reaktionen bis einschließlich der Transkription der cRNA, und endet mit unterschiedlichen Hybridisierungseigenschaften in Abhängigkeit von der Basenkomposition, Inhomogenitäten bei der Nachweisreaktion und der rechnergestützten Bestimmung der Helligkeitswerte. Auch wird vorausgesetzt, dass sich alle Sonden eines *Probesets* in

transkribierten Bereichen befinden. Doch gerade bei aus der Genomsequenz computergestützt vorhergesagten Genen ist dies nicht immer gewährleistet.

In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere gezeigt, dass die Datenqualität auch von den ersten Schritten der computergestützten Analyse abhängt. So erscheint das Rechenverfahren nach Naef (Naef et al., 2002) bei der Umwandlung der Helligkeitswerte aus dem Rohbild in Genexpressionswerte statistisch deutlich robuster, als das vom Hersteller Affymetrix implementierte Verfahren in MASv5. Die weiteren Analysen wurden daher mit den Daten aus dem Verfahren von Naef durchgeführt.

Der designabhängige Fehler, der durch die experimentellen Rahmenbedingungen vorgegeben sein kann: Wünschenswert als Ausgangsmaterial für die Transkriptomanalyse sind isogene Spezies mit homogener transkriptioneller Aktivität, deren Genexpressionsmuster sich nur im experimentell modifizierten Detail unterscheidet. Ideal wäre so beispielsweise ein Vergleich einer entsprechenden Referenz zur Überexpression eines Transkriptionsfaktors in allen Zellen einer Zellkultur. Nicht ideal hingegen ist die Überexpression eines Wachstumsfaktors (→ könnte viele Transkriptionsfaktoren aktivieren) in einem sich entwickelnden Organismus (→ große Fluktuation in der Genaktivität), in dem nur ein Organ über den entsprechenden Rezeptor verfügt (→ die Transkripte der anderen Zellen sind uninformativ und verursachen eher störenden Hintergrund). Gerade zu letztem Punkt sei ein Rechenbeispiel gegeben: Die 5×10^3 Zellen des Embryos zum Zeitpunkt der zygotischen Aktivierung führen jeweils noch drei bis fünf Mitosen durch (Hartenstein, 1993). Das macht im späten Embryo eine Gesamtzahl von schätzungsweise $40\text{--}120 \times 10^3$ Zellen aus, von denen nur $1,6 \times 10^3$ die tracheale Identität haben. Dies entspricht also rund 2% der eingesetzten Zellmasse bei Verwendung ganzer Embryonen.

Die einzige von *Drosophila* verfügbare Zelllinie ist molekular nicht charakterisiert. Weiter zeigte sich zwischenzeitlich, dass die Zellen endogen nicht über Komponenten der BTL-Signalkaskade verfügen (Petit et al., 2004). Daher schieden „Schneider-Zellen“ als Ausgangsmaterial für die Experimente aus. Eine elegante Alternative wäre die ausschließliche Verwendung von Tracheenzellen, die mittels organspezifischer Expression des grün-fluoreszierenden Proteins durch fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (englisch: *fluorescence activated cell sorting*, FACS) gewonnen werden könnten. Praktisch scheitert diese experimentelle Variante aber aufgrund der festen Adhäsion der Tracheenzellen an der ihnen aufgelagerten Chitinschicht, die ihre Dissoziation verhindert (Dr. Reinhard Schuh, persönliche Mitteilung).

3.3.2 Über die Notwendigkeit von Replikaten

Im Ergebnisteil wurde in Hinführung auf die bioinformatische Methodenentwicklung vorgeführt, dass ein exklusiv auf Terminalzellen beschränktes Transkript nach Überexpression von BNL unter Idealbedingungen einen Ratio logarithmierter Signalintensitäten von etwa 1,48 aufweisen müsste. Dies

liegt nur knapp oberhalb, wenn nicht sogar im Bereich statistischer Schwankungen. Es stellt sich daher die Frage, wie viele Replikate durchgeführt werden müssten, um einen echten Ratio von 1,5 bei der Identifikation von Kandidaten von zufälligen Schwankungen unterscheiden zu können.

Die Streuung der gemessenen Signalintensitäten liegt im Schnitt bei etwa 20%. Möchte man einen exklusiv in den Terminalzellen exprimierten Kandidaten per t-Test-Statistik identifizieren und setzt man folgende Rahmenbedingungen:

- 95% der echt positiven Kandidaten soll entdeckt werden
- nur 1 in 10.000 Transkripten soll falsch positiv entdeckt werden (d.h. ungefähr 1/Experiment)
- der Ratio logarithmierter Signalintensitäten sei konservativ 1,45
- die Variation bleibt auch in den anderen Experimenten bei etwa 20%,

so kann man statistisch ermitteln (im Statistikpaket R entspricht dies der Syntax: *power.t.test* (*sd=0.20, power=0.95, delta=1.45, sig.level=0.0001, type="two.sample", alternative="two.sided"*)), dass pro experimenteller Bedingung 4,8 (also 5) Replikate durchgeführt werden müssten, um die verlangte statistische Zuverlässigkeit zu erhalten.

Basierend auf dieser Rechnung bleibt man allein für die durchgeführten Kernexperimente (Wildtyp im Stadium 14 und 17, Überexpression von BNL im Stadium 14 und 17 und Mutante im Stadium 17) noch 15 Transkriptomanalysen schuldig. Sollte man diese Replikate noch durchführen? Bei einem derzeitigen Preis von knapp über 500 Euro pro Experiment mit der *GeneChip*-Technologie ist dies keine rein akademische Frage.

3.4 Das Gen *branchless* wird nicht durch den Hypoxie-abhängigen Transkriptionsfaktor *SIMILAR* reguliert

Es ist gemeinhin bekannt, dass viele pathologische Prozesse im Menschen, wie die zerebrale Ischämie oder die des Herzens, von der gewebeendogenen Sauerstoffkonzentration abhängig sind. In diesem Hinblick wird *Drosophila* aufgrund der einfachen Zugänglichkeit genetischer Analysen zur Massendurchsicht und Identifikation von Genen und Phänomenen eingesetzt, die unter hypoxischen Bedingungen das zelluläre und organismische Überleben sichern sollen (Haddad et al., 1997). So verlangsamt sich unter hypoxischen Bedingungen unter anderem durch Wirkung von Stickstoffmonoxid der Zellzyklus (DiGregorio et al., 2001; Douglas et al., 2001), auch Stoffwechselprozesse von Zuckern (Chen et al., 2002b) und Nukleinsäuren (Ma et al., 2001) werden modifiziert.

Besonders entwicklungsrelevant auf organismischer Ebene ist die tracheale Plastizität in Larven. Es wurde gezeigt, dass die NO-abhängige Proteinkinase G FOR die Anzahl terminaler Tracheenäste unter Hypoxie durch Wirkung der NO-Synthase erhöht (Wingrove und O'Farrell, 1999). Bekannt ist auch, dass verstärkte Expression von BNL terminale Tracheenäste in die Regionen größten Sauerstoffbedarfs leiten können (Jarecki et al., 1999). Gezeigt wurde dies von den Autoren auf Ebene der Proteinmenge.

Analog zum Vertebratensystem gibt es in *Drosophila* einen durch Hypoxie aktivierten Transkriptionsfaktor SIMA (Nambu et al., 1996; Bacon et al., 1998; Lavista-Llanos et al., 2002), der in und um die Tracheen herum exprimiert wird. Alle notwendigen Kofaktoren der Aktivierung und Deaktivierung von SIMA sind evolutionär konserviert (Sonnenfeld et al., 1997; Adryan et al., 2000; Bruick und McKnight, 2001). Eine Reihe von Autoren vertritt die Ansicht, dass *bnl* unter hypoxischen Bedingungen ein Zielgen von SIMA ist (zur Übersicht: Ghabrial et al., 2003). Einen Beweis für die transkriptionelle Aktivierung bleiben diese Autoren aber schuldig.

Es wurden einige Versuche für den Einblick in die Transkriptome nach hypoxischer Haltung und nach Überexpression von SIMA durchgeführt. Wäre das Modell der transkriptionellen Aktivierung von *bnl* durch Hypoxie wahr, so erwartete man eine große gemeinsame Klasse überrepräsentierter Gene unter Hypoxie und den Überexpressionsbedingungen von SIMA und BNL. Dies kann nicht beobachtet werden. Die Transkriptomanalyse zeigt weder unter Hypoxie noch nach Überexpression von SIMA einen statistisch auffälligen Befund für *bnl*, noch für putative Zielgene der BNL-Signalkaskade. Einzig das Gen für die Proteinkinase CNO erscheint nach Überexpression von BNL im Stadium 17 und unter Hypoxie als transkriptionell aktiviert. Aus dem graphentheoretischen Ansatz kann ersehen werden, dass CNO eine Schlüsselposition zwischen den Signalkaskaden von BNL und JAK/STAT inne hat. Die Beobachtung der Aktivierung in beiden Fällen ist daher womöglich von biologischer Relevanz. Fraglich und zweifelhaft bleibt jedoch, ob alleinig diese Übereinstimmung für die Biologie beider Prozesse ausreichend ist. Es kann auch hypothetisiert werden, dass unter der Überexpressionsbedingung von BNL das Transkript von CNO nur deshalb überrepräsentiert erscheint, da die Embryonen endogen hypoxisch sind.

Nach Haltung der Embryonen unter Hypoxie ist das Transkriptom in keiner Weise mit dem des unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Wildtyps vergleichbar. Die Analyse mit dem KEGG-Browser zeigt, dass ausnahmslos alle Stoffwechselwege alteriert sind und dass fast alle in KEGG aufgeführten Signalkaskaden transkriptionell aktiviert erscheinen. In diesen Datensätzen die für die Tracheen morphologisch relevanten Faktoren zu identifizieren, erscheint nahezu unmöglich. Möglicherweise ist der Einsatz einer einmaligen Transkriptomanalyse nach mehrstündiger Haltung der Embryonen unter hypoxischen Bedingungen gewagt. Die Firma Exelixis, San Francisco, USA, führt Transkriptomanalysen an Embryonen von *Drosophila* durch, bei denen die Probennahme über mehrere Stunden im Minutenabstand nach Einsetzen der Hypoxie oder nach Überexpression von SIMA erfolgt (Dr. Herbert Jäckle, persönliche Mitteilung). Aus einer derartigen Datenlage kann dann womöglich die transkriptionelle Antwort auf Hypoxie modelliert werden.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt eindeutig auf dem Verständnis der Funktion von BNL. Unter Beachtung der im Vergleich zur Industrie limitierten Ressourcen wurde daher von einer weiteren Analyse der Reaktion auf Hypoxie und der Überexpression von SIMA abgesehen.

3.5 Die Überexpression von *BRANCHLESS* aktiviert Gene mit putativer Immunfunktion

Der Trivialansatz bei der Auswertung von Transkriptomanalysen ist der direkte Vergleich zwischen zwei Experimenten mittels der Expressionswerte. Der wichtigste Zahlenwert ist dabei der Ratio ihrer logarithmierten Signalintensitäten. In diesem Ansatz erwartet man eine direkte Korrelation von auslösendem Signal und putativem Zielgen. Betrachtet man nun die Liste der 15 oder 20 am deutlichsten überrepräsentierten Transkripte für die Überexpression von BNL im Stadium 14 und 17, so fällt auf, dass diese zumeist über Annotationen im Bereich der Immunabwehr verfügen. Betrachtet man hingegen ähnlich lange Listen der am deutlichsten unterrepräsentierten Transkripte für die Mutantensituation, so sind dies hauptsächlich diejenigen für Gene, die für die Progression des Zellzyklus wichtig sind. Es ist daher denkbar, dass der Verlust der BNL-Signalkaskade zur Verlangsamung der Entwicklung führt, was ein Ausbleiben bestimmter Zellzyklusprozesse zum Zeitpunkt der Probennahme in der Mutanten erklären könnten. Beide Funktionsgruppen würde man nicht unmittelbar mit den Effekten von BNL in der Tracheogenese in Verbindung bringen, da die Proliferation der trachealen Zellen bereits vor der erstmaligen wildtypischen Expression von BNL abgeschlossen ist.

Auch die Betrachtung invers repräsentierter *Probesets*, die in der Überexpression und in der Mutanten gegensätzlich reguliert erscheinen, führt unter Verwendung fixer statistischer Schwellwerte zunächst nicht weiter. Es handelt sich dabei beispielsweise um die *Probesets* für das Lysozym E und drei Serin-Endopeptidase-Inhibitoren, die bereits im Kontext einer Immunantwort beschrieben wurden (De Gregorio et al., 2001), die Cycline A und B3, aber auch die Kinase CNO, deren Bedeutung erst durch weitere Analysen klar wurde.

Die Varianzanalyse ist eine Ausweitung der t-Test-Statistik auf mehr als eine Vergleichsgruppe. Sie bietet sich bei den durchgeführten Transkriptomanalysen beispielsweise für die gleichzeitige Gegenüberstellung aller *bnl*-Genotypen und die Überexpressionen von SIMA in allen Stadien an. Identifiziert werden durch die Varianzanalyse jeweils die unter einer Bedingung besonders auffälligen *Probesets*. Durch anschließende Gruppierungsverfahren können diejenigen ausgewählt werden, die beispielsweise im Falle der Missexpression von BNL invers reguliert sind, unter allen anderen Bedingungen aber keine Veränderung erfahren. Andere statistisch aufwändigere Verfahren zur Identifikation von differentiell repräsentierten *Probesets* beruhen darauf, dass aus der Datengesamtheit eine Normalverteilung modelliert wird, und von ihr abweichende *Probesets* als potentielle Kandidaten gelten. Hierfür wurde die Signifikanzanalyse mit SAM durchgeführt. Besonders fallen erneut mehrere Faktoren der angeborenen Immunität auf.

Mehrere Kandidaten aus den zuletzt erläuterten Auswahlverfahren (so zum Beispiel IM1, IM2, CG16844, CG15065 und CG15068) konnten durch weiterführende Analysen der chromosomalen Region 55C4-55C6 zugeordnet werden. Auch Sequenzanalysen weisen diesem Locus eine besondere

Funktion in der Immunabwehr zu, da alle Faktoren weitestgehend homolog zu IM1 und IM2 sind, die erstmals in einer Proteomanalyse bakteriell infizierter Fruchtfliegen entdeckt wurden und für antimikrobielle Peptide gehalten werden (Uttenweiler-Joseph et al., 1998). Der funktionelle Beweis jedoch steht aus, dass es sich bei den in der IM-Gruppe kodierten Peptiden tatsächlich um antimikrobielle Peptide handelt. Die Expression der Peptide in Bakterien zumindest führt nicht zu Letalität. Das kann an einer Reihe von Gründen liegen. Beispielsweise könnte das Wirkspektrum antimikrobieller Peptide nur bestimmte bakterielle Stämme oder Pilze betreffen, die Peptide könnten eventuell nur extrazellulär wirken, oder es bleiben funktionsnotwendige posttranslationelle Modifikationen aus, wie sie für andere Immunpeptide beobachtet werden (Bulet et al., 1993; Levashina et al., 1995).

Die Transkripte für die putativ antimikrobiellen Peptide sind auch unter einer Reihe anderer experimenteller Bedingungen wie etwa Hunger überrepräsentiert (Dr. Ronald Kühnlein, persönliche Mitteilung). Die genaue Überprüfung bestätigt allerdings, dass diese Überrepräsentation bei weitem nicht die Stärke wie unter der Überexpression von BNL erreicht. Dass es sich bei der transkriptionellen Aktivierung der IM-Gruppe nicht nur um die Reaktion einiger weniger Immunfaktoren wie dort, sondern um eine volle Immunantwort handelt, fällt vor allem beim Vergleich der vorliegenden Messwerte zu den publizierten Daten von zwei Transkriptomanalysen auf, die sich spezifisch mit Immunabwehr beschäftigten (De Gregorio et al., 2001; Irving et al., 2001). Etwa zwei Drittel der dort als immunkritisch aufgeführten Faktoren zeigt auch in der Überexpression von BNL einen mehr oder weniger auffälligen Befund, so zum Beispiel mehrere nicht näher untersuchte Klassen wie geruchsbindende Rezeptoren oder Faktoren mit antioxidativer Funktion.

3.5.1 Mögliche Gründe für die Aktivierung der Immunantwort nach Überexpression von BNL

Die Daten einer weiteren publizierten Transkriptomanalysen deuten zwei verschiedene Signalwege zur Aktivierung von Immungenen an (Boutros et al., 2002). Gram-positive Bakterien werden vom TL-Rezeptor erkannt, der die Signalwege von JNK und CACT/DL zur transkriptionellen Aktivierung von Immunfaktoren veranlasst, und gram-negative Bakterien binden an Rezeptoren, die über den Transkriptionsfaktor REL die Expression dieser Gene veranlassen. Interessanterweise sind die Gene für die Abwehr gram-positiver Bakterien in der Mutanten herunterreguliert, und diejenigen der Signalkaskade über REL durch die Überexpression hochreguliert. Da beispielsweise die Transkripte der IM-Gruppe zwischen den beiden Missexpressionssituationen genau invers repräsentiert sind, bietet sich folgendes Modell an: Die basale Transkriptmenge im Wildtyp ist abhängig vom TL-Signalweg. Daher fehlen die Transkripte in der Mutantensituation. Zusätzlich aber sind sie über REL in der Überexpression von BNL induzierbar. Es stellt sich die Frage nach der biologischen Relevanz dieser Beobachtung, mögliche Gründe werden nachfolgend diskutiert.

Immunfaktoren als Grundausrüstung von Terminalzellen. Zunächst wurde vermutet, dass die Immunfaktoren physiologisch aktiv in den Terminalzellen exprimiert werden. Diese Hypothese ist attraktiv, da die Terminalzellen die Grenze und den Übergang zwischen der Außenwelt und dem Inneren des Tieres definieren. Das Lumen der Tracheen ist zugänglich für Mikroben aller Art, und die epitheliale Barriere verhindert eine Infektion bis zur Phasengrenze der Terminalzellen, an der sich die wässrige Umgebung des Zellarraums und der äußere Luftraum gegenüberstehen. Hier könnten Immunfaktoren als erste Verteidigungslinie gegen mikrobielle Infektionen dienen. Nimmt die Anzahl der Terminalzellen in der Mutanten ab oder in der Überexpressionssituation zu, folgte in Übereinstimmung mit den Messdaten die Transkriptmenge entsprechend.

Die *in situ*-Hybridisierung zeigt jedoch, dass die Immunfaktoren auf den Fettkörper beschränkt sind und nicht in den Tracheen exprimiert werden. Da der Fettkörper mesodermalen Ursprungs ist, der BTL-Rezeptor aber exklusiv in ektodermal abgeleiteten Geweben wie den Tracheen und der Mittellinie exprimiert wird, scheidet eine direkte Aktivierung über den BNL-Signalweg aus.

BRANCHLESS ist ein putativer Botenstoff nach Verletzungen. Es wird diskutiert, dass BNL in Larven nach Verwundung an der Verletzungsstelle exprimiert wird und somit eine Immunantwort, den Wundverschluss und die Rekrutierung wundversorgender Tracheen vermittelt (Galkow und Krasnow, 2001). Ist dieses Modell wahr, bietet es für die vorliegenden Messdaten zwei mögliche hypothetische Interpretationen:

- (1) Durch die Überexpression von BNL wird die tracheale Integrität zerstört. Der Aufbau der epithelialen Barriere, die sonst Schutz gegen mikrobielle Eindringlinge bietet, setzt die wildtypisch definierte Abfolge trachealer Zellen voraus, die nach der Überexpression von BNL nicht mehr gegeben ist. Daher beobachtet man die Aktivierung der Immunfaktoren auch nach der Überexpression des konstitutiv-aktiven BTL-Rezeptors, die einen morphologischen Phänotyp wie die Überexpression von BNL zeigt, und nach Überexpression des Zellkontakt vermittelnden Claudins MEGA, für das auf der molekularen Ebene gezeigt ist, dass es für die epitheliale Barrierefunktion der Tracheen wichtig ist (Behr et al., 2003). Dies wäre in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die transkriptionelle Aktivierung der Immunfaktoren im Fettkörper ausbleibt, wenn durch Überexpressionsversuche mit anderen Treibern und Effektoren die tracheale Integrität nicht so dramatisch gestört wird wie speziell unter BNL- und MEGA-Bedingungen. In der Mutantensituation besteht ebenfalls keine tracheale Integrität, allerdings bleibt die Expression von BNL gleichzeitig aus.
- (2) Durch die Überexpression von BNL werden physiologische und entwicklungsrelevante Prozesse frühzeitig aktiviert, die im Wildtyp erst viel später in den Larvenstadien benötigt werden. Dies erklärt beispielsweise die ektopische Aktivierung der geschlechtsspezifischen

Dosiskompensation (MOF und MSL-3) und Gametenbildung (RETN und TWE), da BNL nur in einem kurzen larvalen Zeitfenster eine Funktion in der Rekrutierung von Zellen in die Imaginalscheiben der prospektiven Gonaden hat (Ahmad und Baker, 2002). Wenn also die zeitliche Entwicklungsinformation verloren geht, so wäre es denkbar, dass die durch die Überexpression entstandenen ektopischen Mengen an BNL im biologischen Kontext als molekulares Indiz einer Verwundung interpretiert werden. Auch dies könnte eine vollständige Immunantwort provozieren.

Beide Hypothesen schließen einander nicht aus, setzen aber voraus, dass BNL tatsächlich eine Rolle nach Verwundung spielt. Dies wäre in anbetracht vergleichbarer Studien an Vertebraten nicht verwunderlich, beachte man nur die FGF-abhängige Regenerationsfähigkeit von Schwanzlurchen oder die deutlich verlangsamte Wundheilung von FGF2-„knock-out“-Mäusen (Ortega et al., 1998).

Immunreaktion auf eine gestörten genregulatorischen Homöostase. Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten bioinformatischen Analysen deuten an, dass eine Reihe zusätzlicher Signalkaskaden durch die Überexpression von BNL aktiviert werden. Einige von ihnen sind direkt mit Funktionen der Immunabwehr verknüpft. Der potentielle Ablauf einer solchen Reaktion wird an anderer Stelle dargestellt (siehe 3.6.3).

3.6 Restriktionen im experimentellen Design erfordern aufwendige bioinformatische Analysen

Die Restriktionen im experimentellen Design sowie die Verfügbarkeit nur weniger Replikate verhinderten eine Auswertung der Transkriptomanalysen durch reinen Listenvergleich, wie er für den Großteil der unter 3.3 erwähnten Studien üblich war. Für die vorliegende Arbeit wurden daher einige bioinformatische Methodiken erdacht und implementiert, welche die Genexpressionswerte nicht isoliert, sondern immer im Kontext zu verschiedenen Annotationen darstellen. Dazu gehören

- die funktionelle *Gene Ontology*-Klassifikation (Ashburner et al., 2000; GeneOntology Consortium, 2001),
- die funktionelle *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*-Klassifikation (Kanehisa und Goto, 2000),
- die anatomische *ImaGO*-Klassifikation für Ergebnisse von im Hochdurchsatz durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen (Tomancak et al., 2002),
- die chromosomale Lokalisation, und
- das biochemische und genetische Interaktom aus dem 2-Hybrid-Hochdurchsatzexperiment der Firma CuraGen (Giot et al., 2003) und der genetischen Interaktionsdatenbank von FlyBase.

Die Verknüpfung publizierter Informationen mit eigenen Messwerten kann zur einfacheren Identifikation biologisch relevanter Prozesse beitragen (zur Übersicht: Ge et al., 2003). Das Programm

GO-Cluster wurde unter der Adresse <http://www.mpibpc.mpg.de/go-cluster> der Öffentlichkeit zugänglich gemacht und steht der akademischen Gemeinschaft frei zur Verfügung (Adryan und Schuh, 2004). Es wurde bei der Implementierung darauf geachtet, dass das Programm für alle Organismen mit GO-Annotation (so auch Zebrafisch *Danio spec.*, Maus und Mensch) und für andere Analyseplattformen (zum Beispiel cDNA-Filter) verwendbar ist. Weitergehende Kenntnisse der zugrunde liegenden informatischen und mathematischen Verfahren sind für den Anwender nicht notwendig. Auch wurden die Verfahren erfolgreich auf die eigenen Messdaten angewendet und führten zum Teil zu Erkenntnissen, die deutlich über den Fokus der ursprünglichen Fragestellung hinausgehen.

3.6.1 Darstellung der Messdaten im Kontext funktioneller Annotationen

Die Projektion der Messdaten als statistisch verwandte Datengruppen auf die Annotation der GO-Datenbank oder als Einzelwert auf die Flussdiagramme der KEGG-Datenbank zeigt die Vielzahl der Prozesse, die unter den untersuchten Bedingungen alteriert sind.

Neben der Kreuzaktivierung anderer Signalkaskaden (siehe 3.6.3) erkennt man, dass entwicklungsstadienabhängig ganze Klassen von Transkriptionsfaktoren und Kinasen als unmittelbarer Vermittler von Signaltransduktion und Genexpression unter BNL-Überexpressionsbedingungen transkriptionell aktiviert werden, und dass in der Mutantensituation insbesondere Kinasen fehlen. Die Summe der Transkriptionsfaktoren im Stadium 14 deutet an, dass selbst zu diesem Zeitpunkt schon viele Entwicklungsentscheidungen getroffen wurden, und die unmittelbaren Zielfaktoren von BNL nur durch einen noch früheren Messzeitpunkt aufgeklärt werden können. Dafür spricht auch die Tatsache, dass der als von BNL abhängig diskutierte Transkriptionsfaktor PNT, der die Bildung der sekundären Tracheenäste vermittelt und somit eine Voraussetzung für die Terminalzellentstehung wichtig ist (Samakovlis et al., 1996a), bereits wieder deaktiviert erscheint. Auch bei einer Vielzahl von Endopeptidasen und Metallopeptidasen fällt eine kritische Abhängigkeit von BNL auf, möglicherweise spielen sie neben ihrer Funktion in der Immunabwehr auch eine Rolle bei der Aktivierung von Proteinen, da sie beispielsweise Vorformen spalten können. Die ähnlich regulierten Membrantransporter könnten eine Rolle in der Bereitstellung von Nährstoffen und Kofaktoren spielen, die für den von BNL forcierten Umbau des Tracheensystems benötigt werden. Auch Gene der Ecdysis und der geschlechtlichen Determination scheinen zum Teil abhängig von BNL zu sein, auch wenn hier wahrscheinlich die verfälschte Entwicklungszeitinformation eine Rolle spielt und die Regulation dann eher als Artefakt zu werten wäre. Es gilt zu erwähnen, dass noch eine Reihe weiterer Genklassen auffällige Befunde zeigen, die aufgrund ihrer Fülle und auch wegen fehlender Erklärungsansätze hier nicht weiter diskutiert werden.

Die durch die ImaGO-Annotation identifizierten und von BNL abhängigen Gene, die im Tracheensystem exprimiert werden, werden an anderer Stelle (3.7) erläutert.

3.6.2 Abbildung der Messdaten auf die chromosomale Lokalisation

Es wurden chromosomale Regionen zusammenhängender transkriptioneller Aktivierung entdeckt. Besonders auffällig aktiviert ist der Bereich 55C4-55C6 mit putativer Immunfunktion nach Überexpression von BNL im Stadium 17. Interessanterweise wird dieser Bereich auch bei einer Studie koregulierter Gene im adulten Kopf als statistisch auffällig erwähnt (Boutanaev et al., 2002), ebenso wird er gonadenspezifisch aktiviert (Dr. Brian Oliver, persönliche Mitteilung). Die mannigfache Anreicherung der Transkripte dieser Gene in anderen Organen suggeriert noch weitere Funktionen dieser Faktoren, die über ihre putativ immunrelevante Funktion hinausgehen.

Bei diesem und auch mehreren anderen chromosomalen Abschnitten erkennt man, dass sich im Zentrum der jeweiligen Region mindestens ein besonders stark aktiviertes Gen befindet und die transkriptionelle Aktivität lateral dazu kontinuierlich abnimmt. Dies trifft auf etwa 25% aller koregulierter Gengruppen der Länge 150 ± 100 kb zu. Interessanterweise handelt es sich dabei um keinen Effekt, der exklusiv für die Überexpression von BNL im Stadium 17 gilt. Vielmehr können auf allen Chromosomen größere Gruppen koregulierter Gene gleicher Lokalisation gefunden werden, die unter mehreren der für die vorliegende Arbeit untersuchten Bedingungen eine chromosomale Koaktivität zeigen. Diese Gene zeigen keinerlei funktionellen Zusammenhang oder Homologie auf Sequenzebene. Die ermittelten Längen der betreffenden chromosomalen Regionen, ihre Verteilung entlang der Chromosomenachse und die Diversität der darauf befindlichen Gene ist in Übereinstimmung mit einer Studie, in der die Genaktivität in über 80 verschiedenen experimentellen Konditionen ermittelt und auf regionale Auffälligkeiten untersucht wurde (Spellman und Rubin, 2002).

Es stellt sich die Frage, ob die lokale Koregulation von Genen innerhalb einer chromosomalen Nachbarschaft biologisch relevant und gewollt ist, oder nur zufällig auftritt. In beiden Fällen wäre die Modifikation des Chromatins der übergeordnete Kontrollschritt vor der Transkription, denn ohne die Auflockerung der Chromatinstruktur haben spezifischen Transkriptionsfaktoren keinen Zugang zur DNA. Im ersten Fall hätte sich die chromosomale Anordnung der Gene evolutionär in derart durchgesetzt, dass im selben Kontext benötigte Gene benachbart sind und die zeit- und ressourcenaufwändige Restrukturierung des Chromatins nur einmal erfolgen muss. Im zweiten Fall würde die Chromatinstruktur spezifisch für einen Transkriptionsfaktor aufgelockert werden, der wiederum spezifisch für das zentral liegende Gen ist. Der größte Teil der Gene aber, die um dieses Zentralgen herum angeordnet sind, würde ebenfalls von weniger spezifischen und allgemeinen Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Aufgrund der vorliegenden Daten erscheinen beide Modelle möglich.

Auch auf der exekutiven Ebene der chromosomalen Genregulation können Beobachtungen gemacht werden: Die Gene der Polycomb- und Trithorax (trxG)-Gruppe sorgen für die anhaltende Blockade oder Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren zu homeotischen Genen (zur Übersicht:

Simon und Tamkun, 2002). Ein Mitglied der trxB-Gruppe ist der Chromatin modifizierende Brahma-Komplex. Zwei seiner Bestandteile, MOR und SNR1, erscheinen abhängig von der Regulation von BNL. Es wäre daher nicht verwunderlich, wenn noch weitere Chromatin modifizierende Proteine von BNL und anderen Faktoren abhängig wären, welche die Koregulation der genannten chromosomalen Nachbarschaften vermitteln.

3.6.3 Die Überexpression von *BRANCHLESS* induziert eine Reihe unterschiedlicher Signalkaskaden.

Die Projektion der Messdaten auf die Flussdiagramme der KEGG-Datenbank sowie der graphentheoretische Ansatz deuten an, dass ganze Signalkaskaden durch die von BNL beeinflusst werden. Beim beobachteten Grad der Kreuzaktivierung erscheint es so durchaus möglich, dass nicht nur Prozesse der Tracheogenese durch die Überexpression von BNL beeinflusst werden, sondern auch Immunreaktionen ausgelöst werden können.

Die Analyse der Flussdiagramme aus der KEGG-Datenbank zeigt eine putativ janusköpfige Reaktion dieser Art, die Interaktion der JAK/STAT-Signalkaskade mit BNL. Sie ist sowohl für Entwicklungs- als auch immunologische Prozesse wichtig (siehe dazu: 3.7.3). Auch andere bekannte Signalkaskaden wie die des transformierenden Wachstumsfaktors oder das NOTCH/DELTA-System scheinen im Verlauf der Embryogenese zunehmend von BNL beeinflusst zu sein (siehe ebenfalls: 3.7.3).

Besonders interessant erscheint das Konzert genetischer Interaktionen bei der Betrachtung des graphentheoretischen Ansatzes. Die Interpretation der Ergebnisse ist allerdings nicht ganz einfach und höchst hypothetisch. So werden im Ergebnisteil für die Mutantensituation und die Überexpression von BNL in beiden untersuchten Entwicklungsstadien getrennte Subgraphen dargestellt. Tatsächlich handelt es sich dabei um eine Visualisierungshilfe, die nur solche an einer Interaktionen beteiligten Faktoren darstellt, die unter der jeweiligen Bedingung betragsmäßig eine Regulation $> 0,5$ zeigen, also eine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp eintritt, die größer als die statistische Schwankung um den Ratio 0 ist. Zusätzlich werden nur solche Faktoren einbezogen, deren Expression statistisch unabhängig (Korrelationskoeffizient = 0) oder sogar koreguliert (Korrelationskoeffizient = 1) ist. Durch die Überlagerung der Subgraphen erkennt man, dass alle bekannteren Signalkaskaden der Embryonalentwicklung von *Drosophila* in irgendeiner Weise von BNL abhängig sind (Vielzahl an Regulationen im Subgraph für die Mutante), ein Teil sogar durch BNL induzierbar ist (Subgraphen für die Überexpression). Kernpunkt der Analyse ist die Identifikation von Superknoten, die kritisch von BNL abhängig sind, in mindestens zwei der drei Subgraphen auftreten, und die eine Vielzahl von Interaktionen verschiedener Signalkaskaden haben. Dies wären beispielsweise die Kinasen CYCE, CNO und die GTPase RAS85D. Verfolgt man nun in einer Flussanalyse die Route von BNL über Zwischenknoten und Superknoten zu den verschiedenen Signalkaskaden, so erscheint es denkbar, dass

– zumindest formal mathematisch – das BNL-Signal zu verschiedenen Anteilen in die Aktivierung der anderen Signalkaskaden wie JAK/STAT oder NOTCH/DELTA mündet. Gerade am Beispiel von JAK/STAT wiederum weiß man, dass es eine Reihe von positiven Rückkopplungseffekten gibt, die beispielsweise nach Aktivierung von STAT92E die gesamte Signalkaskade transkriptionell aktivieren (Dr. Martin Zeidler, persönliche Mitteilung). Dies ist ein Faktum, welches für die Betrachtung der BNL-abhängigen Signalkaskaden generell nicht vergessen werden sollte.

Die Bestätigung einer solchen Flussanalyse mit Rückkopplungseffekten ließe sich nur über die vollständige Rekonstruktion der genregulatorischen Netzwerke im Rahmen eines systembiologischen Ansatzes erreichen (zur Übersicht: Barabasi und Oltvai, 2004), wie er mit und ohne Zuhilfenahme der funktionellen Annotationen vorgeschlagen wird (zur Übersicht: Bolouri und Davidson, 2002; Ge et al., 2003; Friedman, 2004).

3.7 Es gibt spezifische Zielgene für *BRANCHLESS* im Tracheensystem

Die wichtigste Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Identifikation von trachealen Zielgenen der BNL/BTL-Signalkaskade. Durch die Kombination einer Reihe von bioinformatischen Methodiken konnten letztlich mindestens zwanzig tracheale Faktoren identifiziert werden, die kritisch von BNL abhängig oder zumindest durch BNL induzierbar sind. Drei weitere Faktoren zeigen eine besonders starke transkriptionelle Aktivierung in der Mutantensituation, werden also durch BNL reprimiert. Die Expression dieser Gene in den Tracheen konnte mittels *in situ*-Hybridisierung bestätigt werden. Ihre putative Rolle in der Tracheogenese soll diskutiert werden.

3.7.1 Gene ohne Annotation.

Für die Gene CG15786, CG9070, CG4089, CG5175, CG32548, CG32499 und CG10112 ist keinerlei Annotation vorhanden, sie zeigen auch keine Sequenzähnlichkeit zu anderen Genen. Die Gemeinsamkeit der ersten fünf Gene ist die transkriptionelle Aktivierung durch BNL. Die Gene CG32499 und CG10112 sind in der Mutantensituation überaktiviert und zeigen in der Überexpression von BNL keinen auffälligen Befund. Für CG32548 ist eine Fliegenlinie mit letaler P-Element-Insertion verfügbar.

3.7.2 Gene mit Annotation aufgrund von Sequenzähnlichkeit.

Die Gene *gasp* und CG17052 sind in der Mutantensituation überaktiviert, ihre Regulation wurde durch die SAM-Analyse als statistisch auffällig klassifiziert. Ihre gemeinsame Funktion ist die eines chitinbindenden Strukturelements der peritrophen Membran. Dennoch wurde die Expression von *gasp* in den Tracheen auch an anderer Stelle bestätigt (Barry et al., 1999). In der Publikation diskutieren die Autoren eine potentielle Filter- und Immunfunktion. Trifft diese Interpretation zu, bleibt dennoch die

Frage offen, warum beide Faktoren in der Mutantensituation statistisch signifikant überrepräsentiert sind.

Das Protein des Gens *yip7* (*yippee interacting protein 7*) wird aufgrund von Sequenzähnlichkeit als extrazelluläre Metalloprotease diskutiert (Beaucher et al., 2003). Eine putative Funktion könnte die Desintegration der die Tracheen umgebenden extrazellulären Matrix sein. Das Gen CG6718 kodiert für eine Phospholipase A2, für die es eine Linie mit P-Element-Insertion gibt. Durch die Lipase gebildeten Fettsäuren könnten Immunreaktionen auslösen (Yajima et al., 2003), was eine Erklärung für die Messdaten liefern könnte. Auch der putative Immundefektor IM10 wird in den Tracheen exprimiert. Die Faktoren CG14622 („Aktin-bindend“), CG1259 („kutikuläres Protein“), CG4089 („Glutathionsynthase“), CG4115 („Lektin“), CG32209 („Lipoprotein-Rezeptor“), CG33167 („Rho-GEF“) und CG8312 („mit Phosphotyrosin interagierende Domäne“) zeigen nur geringe Sequenzähnlichkeit zu anderen Faktoren, ihre elektronische Annotation beruht auf kurzen übereinstimmenden Fragmenten. Für CG4089 ist eine Linie mit P-Element-Insertion verfügbar. Von all den zu dieser Gruppe gehörenden Proteinen ist PRAY FOR ELVES (PFE) der am umfassendsten annotierte Faktor. Es handelt sich dabei um eine Transmembranrezeptorkinase, für die man eine Funktion in der Zelladhäsion diskutiert (Hynes und Zhao, 2000).

3.7.3 Gene mit bekannter Funktion im Tracheensystem und anderen Organen.

Das Gen *axn* (*axin*) ist im embryonalen Stadium 17 kritisch von BNL abhängig. Bei AXN handelt es sich um einen Inhibitor der WINGLESS-Signalkaskade, der seine Funktion durch die Bindung von β -Catenin ausübt (Willert et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von AXN die Bildung trachealer Fusionszellen und die Expression von SAL im dorsalen Hauptstamm verhindert, und dass dies zu einer ektopischen Expression von DSRF in den betreffenden Zellen führt (Chihara und Hayashi, 2000). Die Ausbildung von Terminalzellen wird weiter gefördert, da durch die Überexpression von AXN die Bildung von DL unterdrückt und somit das Prinzip der lateralen Inhibition von Fusions- und Terminalidentität ausgesetzt wird. Dazu in Übereinstimmung erkennt man, dass der Gegenspieler von DL, das Protein NOTCH, durch die Überexpression von BNL deutlich transkriptionell aktiviert wird, was die Ausbildung der Terminalzellidentität favorisiert (Ikeya und Hayashi, 1999; Llimargas und Casanova, 1999). So könnte bereits die Überaktivierung von AXN einen großen Teil des Überexpressionsphänotyps von BNL erklären. AXN ist also entwicklungsbiologisch bereits gut charakterisiert, genetische Werkzeuge sind verfügbar.

Auch TANTALUS (TAN) ist spätembryonal kritisch von BNL abhängig. Das Protein ist ein Interaktionspartner von ADDITIONAL SEX COMBS (ASX), das Bestandteil der Trithorax- und Polycomb-Komplexe ist und somit eine Rolle in der breiten Aktivierung chromosomaler Bereiche spielt (Dietrich et al., 2001). Da die Wirkbreite von ASX enger und spezifischer ist als die anderer Proteine der Komplexe, werden ASX und TAN auch als organspezifische Koaktivatoren gehandelt.

Das Homologe des transformierenden Wachstumsfaktors, DECAPENTAPLEGIC (DPP), und sein Rezeptor THICKVEINS (TKV) vermitteln über die Transkriptionsfaktoren der KNIRPS-Familie wildtypisch die Spezifikation der dorsalen Tracheenäste und der lateralen Hauptstämme (Vincent et al., 1997; Wappner et al., 1997; Chen et al., 1998). Auch spielt TKV eine Rolle in der Spezifikation der Fusionsidentität (Steneberg et al., 1998; Llimargas, 2000). TKV ist in der Überexpressionssituation leicht überrepräsentiert und in der Mutantensituation leicht unterrepräsentiert. Die Analyse im KEGG-Browser zeigt, dass auch nachgeschaltete Faktoren der Signalkaskade entsprechend reguliert sind. Möglicherweise hängt hiermit auch die transkriptionelle Aktivierung von *alp23B* zusammen, das als TGF- β -Homologes annotiert ist. Es ist vorstellbar, dass es sich dabei um eine genetische Gegenreaktion zum allgegenwärtigen Verlust der Fusionsidentität zugunsten der Terminalzellidentität handelt.

Bei LOCO (LOCOMOTION DEFECTS) handelt es sich um eine kleine GTPase, die genetisch mit PNT interagiert (Granderath et al., 1999). Dieser Transkriptionsfaktor ist wichtig für eine Differenzierung von Tracheenzellen zur sekundären Identität, die einen Vorläufer für die Terminalzellidentität darstellt. Es ist daher vorstellbar, dass LOCO nach Überexpression von BNL zum Teil für die beinahe vollständige Umdifferenzierung des Tracheensystems zur Terminalzellidentität verantwortlich ist. Genetische Werkzeuge für die Analyse der Funktion des Gens sind verfügbar und diverse Mutanten sind charakterisiert, wobei die Betrachtung des trachealen Phänotyps bisher nur oberflächlich dokumentiert wurde (Granderath et al., 1999).

Eine doppelte Rolle für die JAK/STAT-Signalkaskade? Der Transkriptionsfaktor STAT92E und genetisch mit ihm interagierende Faktoren sollen an dieser Stelle detailliert betrachtet werden. Er ist der Dreh- und Angelpunkt für eine Reihe von in sich schlüssigen Beobachtungen, die Indiz für eine Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade auf mehreren Ebenen sind:

- STAT92E wird in der statistischen Analyse als kritisch von BNL abhängiger Kandidat auffällig.
- STAT92E ist in der ImaGO-Datenbank als trachealer Faktor annotiert und wurde auch nach Analyse mit GO-Cluster als Kandidat identifiziert.
- Die Analyse mit KEGG-Browser zeigt, dass durch die Überexpression von BNL im Stadium 14 zunächst der Ligand UNPAIRED (UPD) für die JAK/STAT-Signalkaskade transkriptionell überrepräsentiert ist, im Stadium 17 dann zusätzlich die nachgeschalteten Faktoren STAT92E und der transkriptionelle Koaktivator NEJIRE (NEJ). Alle genannten Faktoren sind in der Mutantensituation transkriptionell unterrepräsentiert.
- Die durch den graphentheoretischen Ansatz identifizierten RAS85D und CYCE interagieren über mehrere gemeinsame Partner genetisch miteinander. Beide sind kritisch abhängig von BNL. Für RAS85D wurde gezeigt, dass die Überexpression im Tracheensystem zu einem Phänotyp führt, der an leichte Überexpressionsphänotypen von BNL erinnert (Imam et al., 1999). CYCE bindet STAT92E und hat eine aktivierende Wirkung auf den Signalweg (Chen et al., 2003).

Die JAK/STAT-Signalkaskade wurde schon in Hinblick auf ihre Rolle in der Embryogenese und spezieller Tracheogenese untersucht. Der Ligand für den Signalweg wird in der frühen Embryogenese zunächst wie ein Paarregelman exprimiert. Nach der Bildung der Tracheenplakoden bleibt UPD auf diese beschränkt (Harrison et al., 1998). Der Funktionsverlust des Rezeptors DOMELESS (DOME) zeigt ebenso wie der Funktionsverlust von STAT92E einen trachealen Phänotyp (Brown et al., 2001; Chen et al., 2002a). Dabei gibt es in Abhängigkeit von der Ausprägung der Mutantenallele deutliche Unterschiede. Durch amorphe Allele von *dome* und *stat92e*, ebenso wie beim Verlust der JAK-Kinase HOPSCOTCH (HOP) (Chen et al., 2002a), bleibt die Expression von TRH und somit die Bildung der trachealen Zellidentität völlig aus. Durch hypomorphe Allele entsteht ein milderer Phänotyp, jedoch bleiben die Fusion der dorsalen Hauptstämme und die Migration anderer primärer Tracheenäste aus. Interessanterweise kann ein solcher Phänotyp auch bei Verlust der STAT92E-Kofaktoren NEJ (Takaesu et al., 2002) und CycE (Chen et al., 2003) beobachtet werden. Überraschend ist daher die Beobachtung, dass diese Faktoren teilweise kritisch von BNL abhängig sind, zumal sowohl der Ligand als auch die nachgeschalteten Kofaktoren in den Tracheen exprimiert werden und das Zweikomponentensystem nicht zellulär getrennt ist. Interessanterweise wird auch in zwei Studien im Vertebratensystem deutlich, dass FGF-Signalkaskade und JAK/STAT-Signalweg im selben biologischen Kontext benötigt werden und dass FGF der Auslöser für die STAT3-Phosphorylierung ist (Deo et al., 2002; Ebong et al., 2004). Dies ist relevant zusammen mit der Kenntnis über die zusätzliche Aktivierung von STAT92E durch die den Transkriptionsfaktor bindende Kinase CYCE (Chen et al., 2003), die über RAS85D offensichtlich ebenfalls von BNL abhängig ist und eine Alternative zur in Zellkultur beobachteten Aktivierung durch SRC (Deo et al., 2002) bieten könnte. Die Induzierbarkeit des sekretierten Faktors UPD durch BNL ermöglicht noch eine weitere Interpretation: So spielen die genannten Faktoren eine Rolle in der Auslösung der angeborenen Immunantwort (Boutros et al., 2002, zur weiteren Übersicht: Agaisse und Perrimon, 2004).

ABNORMAL WING DISCS ist ein negativer Regulator für den BREATHLESS-Rezeptor.

Besondere Erwähnung verdient das Gen *abnormal wing discs (awd)*, da seine tracheale Funktion durch sämtliche statistische Verfahren und bioinformatische Analysen unentdeckt geblieben ist, die Transkriptomanalyse dennoch zu seiner Charakterisierung in der Tracheogenese führte.

Das *Drosophila*-Homologe des von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorproteins (DVHL) wird als negativer Regulator von SIMA unter normoxischen Bedingungen und daher als potentieller indirekter Regulator von BNL diskutiert (zur Übersicht: Ghabrial et al., 2003). Tatsächlich wurde gezeigt, dass DVHL die Migration trachealer Zellen in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* kontrolliert, aber in den Tracheenzellen selbst exprimiert wird (Adryan et al., 2000) und daher keinen Einfluss auf die Transkription von *bnl* außerhalb des Tracheensystems haben sollte. Im Vorfeld und unabhängig von der transkriptionellen Untersuchung der BNL-Signalkaskade wurde in Nachbereitung meiner

Diplomarbeit im Labor von Dr. Tien Hsu, Medical University of South Carolina, (Adryan, 2000) eine 2-Hybrid-Untersuchung an DVHL durchgeführt. Als Ergebnis der Untersuchung erschienen fünf Faktoren als attraktive Kandidaten zur weiteren Bearbeitung, darunter AWD. Aufgrund meines Laborwechsels zur Promotionsstelle blieben sie aber zunächst unbearbeitet.

Es erscheint logisch, dass direkte Interaktionspartner von dVHL auch in den Tracheen exprimiert sein sollten. Daher wurden die Kandidaten der 2-Hybrid-Untersuchung im Verlauf der Transkriptomanalyse als tracheal exprimierte Gene vermerkt. Es zeigt sich, dass *awd* unter der Überexpression von BNL leicht und unter der Überexpression von SIMA und unter Hypoxie stärker reprimiert wird. *In situ*-Hybridisierungen bestätigten die Expression von *awd* in den Tracheen, obgleich das Gen zuvor nur als Morphogen in den Imaginalschreiben der Flügel diskutiert wurde (Rosengard et al., 1989).

In ständigem Austausch mit dem Labor von Dr. Tien Hsu wurde dort aufgrund dieser Erkenntnisse die Arbeit an AWD wieder aufgenommen. Es zeigt sich, dass AWD ein negativer Regulator von BTL ist und eine Funktion in der Internalisierung des Rezeptors nach Bindung des Liganden hat (Dammai et al., 2003). Niedrigere Dosen an AWD führen somit zur Verstärkung der Signalwirkung, eine negative Regulation von AWD durch die Überexpression von BNL deutet einen positiven Rückkopplungsmechanismus für die Signalkaskade an. Die Herunterregulation von *awd* durch Überexpression von SIMA und durch Hypoxie ist konsistent mit der Vorstellung, dass der BNL-Signalweg unter diesen Bedingungen aktiviert wird. Allerdings wird nicht der Ligand BNL transkriptionell aktiviert, sondern die Deaktivierung des aktivierten Rezeptors reprimiert. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Resultate suggerieren zusammen mit publizierten Daten eine weitere Funktion von AWD im Tracheensystem. So wird berichtet, dass AWD ein negativer Regulator der membrangebundenen JAK-Kinase HOP ist (Zinyk et al., 1993). Eine Verknüpfung zur trachealen JAK/STAT-Signalkaskade ist demnach denkbar, die Herunterregulation von AWD führte demnach zur Signalverstärkung auch dieses Signalwegs.

3.8 Die Stickstoffmonoxid-Signalkaskade hat tracheale Funktionen, die von Branchless unabhängig sind

Die deutliche Immunantwort des Fettkörpers nach Überexpression von BNL oder nach Überexpression eines konstitutiv-aktiven BTL-Rezeptors in den Tracheen spricht dafür, dass es weitere durch die BNL/BTL-Signalkaskade aktivierte Botenstoffe geben muss, die diese Reaktion zwischen dem Tracheensystem und dem Fettkörper vermitteln. Neben der putativen Auslösung der Immunantwort durch die JAK/STAT-Signalkaskade lassen die Daten der Transkriptomanalyse und Erkenntnisse publizierter Studien vermuten, dass es sich dabei um das Stickstoffmonoxid-Radikal handelt. So vermittelt NO eine Immunantwort im larvalen Fettkörper durch gesteigerte Aktivität der

NO-Synthase in Zellen des Darms, wenn die Tiere bakteriell kontaminiertes Futter zu sich nehmen (Foley und O'Farrell, 2003). Zusätzlich ist es wichtiger Botenstoff unter hypoxischen Umweltbedingungen, eine NO-abhängige Proteinkinase G namens FOR ist notwendig für die tracheale Plastizität (Wingrove und O'Farrell, 1999). Interessant ist dies daher, weil die Transkriptomanalyse eine Interpretation in der Richtung erlauben, dass BNL die Bildung von NO durch gezielte Steuerung von Enzymen begünstigt und auch FOR kritisch von BNL abhängig ist.

Der Zusammenhang von BNL und NO-Signalkaskade konnte nicht etabliert werden. Der dafür notwendige direkte Nachweis von NO im Embryo ist nicht gelungen. In allen untersuchten *bnl*-Genotypen sind die Transkripte für die NO-bildenden Enzyme durch *in situ*-Hybridisierung nur im Nervensystem deutlich nachzuweisen, dies neben einer leichten ubiquitären Färbung, die auch die Tracheen betrifft. Zusätzlich wird die Hypothese dadurch entkräftet, dass die Expression eines konstitutiv-aktiven BTL-Rezeptors in Zellkultur ebenfalls nicht zur Bildung von NO führte.

Allerdings konnte durch die Überexpression der NO-Synthase und der NO-abhängigen Kinase FOR spezifisch in den Tracheen gezeigt werden, dass beide Faktoren in ektoischen Dosen das tracheale Erscheinungsbild in ähnlicher Weise modifizieren. So treten mehrfache Verzweigungen terminaler Tracheenäste auf, die Auswuchsrichtung weicht vom Wildtyp ab und es treten im Wildtyp unübliche Überkreuzungen terminaler Äste auf. Interessanterweise werden diese Effekte für die ektoische Expression von NO-Synthase um so stärker, je weiter sich das Tier in den Larvalstadien befindet. Für die Überexpression von FOR kann man beispielsweise an den viszeralen und dorsalen Äste schon spät embryonal einen Phänotyp beobachten. Dies ist nicht verwunderlich, zeigt sich hier im Gegensatz zur NO-Synthase schon embryonal eine deutliche Expression in den Tracheen. Allerdings scheint FOR nur eine zusätzlich induzierende Funktion für die Bildung neuer terminaler Verzweigungen zu haben, denn die Mutante zeigt keinen auffälligen Phänotyp.

Die vorgelegten Daten sprechen dafür, dass FOR bereits embryonal eine permissive Funktion haben kann, die eventuell nicht exklusiv von NO abhängig ist.

3.9 Kritische Würdigung und Ausblick

Auf den ersten Blick erscheint die Ausbeute von etwa zwanzig trachealen und von BNL abhängigen Genen mäßig. Keiner der identifizierten Faktoren kann als Zielgen erster Ordnung genannt werden, und ist für die Zielgene überhaupt eine Annotation vorhanden, so handelt es sich zum größten Teil um Faktoren, die bereits im trachealen Kontext beschrieben wurden. Die der Transkriptomanalyse nachfolgende Betrachtung der Kandidaten beschränkte sich auf die *in situ*-Hybridisierung, viele vermutete genetische Zusammenhänge sind nur diskutiert, nicht experimentell bestätigt worden. Die vermutete genetische Abhängigkeit von BNL/BTL- und NO-Signalweg trifft wahrscheinlich nicht zu.

Dennoch ist die vorliegende Arbeit als Erfolg zu werten. So wurden durch den Einsatz neuer bioinformatischer Methoden aus einer suboptimalen und schwierigen Datengrundlage heraus genau solche Faktoren identifiziert, die für die weitere Erforschung der Tracheogenese relevant sein können, insbesondere bei der Betrachtung von BNL abhängiger Prozesse. Weiter gilt anzumerken, dass die bisher publizierten genomweiten Transkriptomanalysen von *Drosophila* und anderen Organismen üblicherweise Einreichungen von bis zu zehn Wissenschaftlern waren, die über mehrere Jahre und mittels starker finanzieller Unterstützung der Industrie (Dr. Boris Eggers, persönliche Mitteilung) in einem interdisziplinären Team arbeiteten. Unter der Betrachtung, dass ein solches Unterfangen mit sehr ungünstigen Ausgangsbedingungen (experimentelle Notwendigkeit: Überexpression eines Wachstumsfaktors im sich entwickelnden Embryo) gestartet wurde, kann man mit dem vorliegenden Ergebnis nach der für Promotionsstipendien üblichen Förderungsdauer von drei Jahren durchaus zufrieden sein.

Die weitere Bearbeitung der vorliegenden Daten kann in zwei Richtungen betrachtet werden. Können noch mehr Transkriptomanalysen zu anderen Zeitpunkten der Embryogenese durchgeführt werden, so bietet sich eine detaillierte Aufklärung der genregulatorischen Netzwerke *in silico* an. Die Kreuzaktivierung der anderen Signalkaskaden und letztlich aller Zielgene durch BNL könnte damit aufgeklärt werden. Dies setzt allerdings einen derzeit für die Arbeitsgruppe von Dr. Schuh nicht realisierbaren finanziellen Rahmen voraus.

Im eigentlichen Fokus der Arbeitsgruppe ist die Überprüfung der vorgeschlagenen genetischen Abhängigkeiten und die Funktionsaufklärung für die bisher nicht annotierten Kandidaten, wobei sich letzteres aus Ermangelung an Mutanten und Linien mit P-Element-Insertion als schwierig gestalten könnte. Vielversprechend erscheint derzeit die experimentelle Überprüfung der Abhängigkeit zwischen BNL und der JAK/STAT-Signalkaskade. Für alle Komponenten der letzteren Kaskade sind Mutanten und andere genetische Werkzeuge vorhanden. Die Betrachtung der Überexpression von BNL im Hintergrund hypomorpher Allele von UPD, DOME und STAT92E könnte ein erster Schritt für die Überprüfung der Hypothese sein.

Anbetracht der vielen neuen Herausforderungen und mit besonderem Respekt für die Kuratoren von FlyBase, die teilweise aus Idealismus und ohne die Befriedigung eigener wissenschaftlicher Arbeit die Datengrundlage für die bioinformatischen Auswertungen in dieser Arbeit geschaffen haben, schließe ich die Diskussion mit dem Seufzer, der dem Kandidatengen *pray for elves* namensgebend war:

From: Suzanna Lewis <suzi@fruitfly.org> Tue Oct 22 2002

Subject: Re: naming a gene \- ACTION REQUIRED THIS WEEK

To: Rachel Drysdale (Genetics) <rd120@gen.cam.ac.uk>

the name for my gene is PrayForElves

it is this gene: [CG15151]

It is the middle of the night (2:38 to be precise),
I am away from friends and family, It has been
this way for over 2 years, I can't sleep because
of all the work there is yet to do, and there
is no end in sight. So when do the magic
little elves appear out of nowhere and get
everything done?

\-S

p.s. I am serious.

Referenz: <http://www.flybase.org/.bin/fbidq.html?FBrf0151677>

4 Material und Methoden

Die für die vorliegende Arbeit benutzten Methoden sind laborüblichen Methodensammlungen (für die Molekularbiologie: Ausubel et al., 1989; Sambrock et al., 1989, für die Arbeit mit Fruchtfliegen: Ashburner, 1989; Greenspan, 1997; Roberts, 1998) und Referenzhandbüchern zu entnehmen. Individuelle Modifikationen und Besonderheiten werden im folgenden Kapitel beschrieben.

Verwendete Materialien wurden in jeweils benötigter Qualität und vom preisgünstigsten Anbieter bezogen und werden nur im relevanten Falle spezifiziert. Namen der Anbieter werden nur bei der ersten Nennung durch den Firmensitz ergänzt. Zweifach deionisiertes und autoklaviertes Wasser, Bakterienmedien sowie Material zur Fliegenhaltung wurden als zentraler Service in der Abteilung gestellt. Auch die Reinigung wiederverwendbarer Labormaterialien sowie Sterilisation von Arbeitsmaterialien und Lösungen erfolgte als abteilungsinterne Dienstleistung.

4.1 Arbeit mit Fruchtfliegen

Die Haltung der Fliegen erfolgte in klimatisierten Räumen (18 °C für längerfristige Haltung, 25 °C für Amplifikation, während Kreuzungsexperimenten und für die Kollektion von Embryonen). Zur Erhaltung der Stämme wurden adulten Fliegen regelmäßig in frische Futterröhrchen überführt.

4.1.1 Benutzte Fliegenstämme und Genetik

Die benutzten Fliegenstämme (siehe **Tabelle 10**) der Art *Drosophila melanogaster* (Meigen) waren zumeist aus der abteilungsinternen Kollektion verfügbar. Andernfalls wurden sie von der akademischen Stammsammlung der Universität Bloomington, Indiana, USA, oder von wissenschaftlichen Kollegen anderer Institute bezogen.

Tabelle 10: Übersicht über die benutzten Fliegenlinien. Der Stammname entspricht der durchgängigen Bezeichnung in der vorliegenden Arbeit und der Genotyp ist die kurze Trivialbeschreibung der genetischen Besonderheit der jeweiligen Linie.

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
Referenzlinien			
Oregon R (OreR)	Laborwildtyp	Referenz	Herkunft unbekannt
<i>w^{67c23}</i>	Punktmutation in <i>white</i>	Hintergrundstamm für Keimbahntransformationen	Herkunft unbekannt
Linien für die genetische Balancierung			
<i>croc^{5f59}</i>	<i>croc59</i> / TM3	Donor für das TM3-Balancier-Chromosom III	Hacker et al., 1995
<i>croc^{5f59-ftz-lacZ}</i>	<i>croc59</i> / TM3 ^{<i>ftz-lacZ</i>}	genetisch markierte Variante des TM3-Balancier-Chromosoms	Hacker et al., 1995
<i>croc^{5f59-GFP}</i>	<i>croc59</i> / TM3 ^{GFP}	genetisch markierte Variante des TM3-Balancier-Chromosoms	Herkunft unbekannt
<i>sal</i>	<i>sal</i> / CyO	Donor für das CyO-Balancier-Chromosom II	Herkunft unbekannt

Markerstämme			
<i>l-eve-1</i>	nichtmutagene Insertion in die Promotorregion von <i>trachealess</i>	treibt die Expression von β -Galaktosidase, Marker für Tracheenzellen	Perrimon et al., 1991
<i>srf-lacZ</i>	nichtmutagene Insertion in die Promoterregion von <i>dsrf</i>	treibt die Expression von β -Galaktosidase in trachealen Terminalzellen	Samakovlis et al., 1996b
Mutationen/Defizienzen			
<i>bnl</i> ^{P1}	letale P-Element-Insertion	Untersuchung des Funktionsverlusts von <i>branchless</i>	Sutherland et al., 1996
<i>for</i> ^{Rovers}	natürlicher Polymorphismus, Allel von <i>foraging</i>	Referenz für die Untersuchung an <i>foraging</i>	Osborne et al., 1997
<i>for</i> ^{Sitters}	natürlicher Polymorphismus, leicht hypomorphes Allel von <i>foraging</i>	Untersuchung des leichten Funktionsverlusts von <i>foraging</i>	Osborne et al., 1997
<i>for</i> ⁰⁶⁸⁶⁰	letale P-Element-Insertion in <i>foraging</i>	Untersuchung des starken Funktionsverlusts von <i>foraging</i>	Spradling et al., 1999
Treiberlinien für das GAL4/UAS-System⁵			
<i>btl</i> -GAL4	nichtmutagene Insertion in die Promoterregion von <i>breathless</i>	treibt die Expression von GAL4 in allen Tracheenzellen	Shiga et al., 1996
G445-GAL4	nichtmutagene Insertion in einem unbekannten Gen	treibt die Expression von GAL4 im Hinterdarm sowie der Epidermis	Dr. Michael Hoch, Universität Bonn, unveröffentlicht
<i>srf</i> -GAL4	nichtmutagene Insertion die Promotorregion von <i>dsrf</i>	treibt die Expression in trachealen Terminalzellen sowie einigen anderen Zellen vor dorsalem Hauptstamm und Darm	Dr. Christos Samakovlis, Universität Umea, Schweden, unveröffentlicht
Effektorlinien für das GAL4/UAS-System			
UAS- <i>bnl</i> ^{aktiviert}	nichtmutagene Insertion auf Chromosom II	ektopische Expression eines konstitutiv-aktiven <i>breathless</i> -Rezeptors	Reichman-Fried et al., 1994
UAS- <i>bnl</i>	nichtmutagene, X-chromosomale Insertion	ektopische Expression von <i>branchless</i>	Sutherland et al., 1996
UAS- <i>for</i> ^{T1}	nichtmutagene Insertion auf Chromosom II	ektopische Expression von <i>foraging</i> , längeres Transkript	Dr. Marla Sokolowski, Universität Toronto, Kanada, unveröffentlicht
UAS- <i>for</i> ^{T2}	nichtmutagene Insertion auf Chromosom II	ektopische Expression von <i>foraging</i> , kürzeres Transkript	Dr. Marla Sokolowski, unveröffentlicht
UAS- <i>globin</i>	nichtmutagene Insertion, verfügbar auf allen Chromosomen	ektopische Expression von <i>globin</i>	diese Arbeit
UAS- <i>nos</i>	mutagene Insertion auf Chromosom II	ektopische Expression des Gens für Stickstoffmonoxid-Synthase	diese Arbeit

⁵ Das GAL4/UAS-System ist der Hefegenetik entlehnt und erlaubt die ektopische Expression beliebiger Gene in *Drosophila* (Brand, A. H., und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.). Es beruht auf der gewebespezifischen Expression des Transkriptionsfaktors GAL4 aus *Saccharomyces spec.*, der spezifische DNA-Bindesequenzen (englisch: *upstream activator sequence*, UAS) erkennt und zur Transkription nachfolgender Genabschnitte führt. Praktisch erreicht man dies durch die Kreuzung einer Treiber- und einer Effektorlinie. Die Generierung sowohl der GAL4- als auch der UAS-Linien erfolgt durch Keimbahntransformation.

UAS- <i>nos</i> ^{RNAi}	Insertionen auf den Chromosomen II und III	für die Deaktivierung von Stickstoffmonoxid-Synthase durch interferierende RNA	diese Arbeit
UAS- <i>sima</i> ^l	nichtmutagene Insertion auf Chromosom II	ektopische Expression von <i>sima</i>	diese Arbeit
UAS- <i>sima</i> ^w	nichtmutagene Insertion auf Chromosom II	ektopische Expression von <i>sima</i>	Lavista-Llanos et al., 2002
UAS- <i>srf</i>	nichtmutagene Insertion auf Chromosom II	ektopische Expression von <i>dsrf</i>	diese Arbeit
UAS- <i>lacZ</i>	nichtmutagene Insertion, verfügbar auf allen Chromosomen	für die ektopische Expression von β -Galaktosidase	Herkunft unbekannt
UAS-GFP	nichtmutagene Insertion, verfügbar auf allen Chromosomen	für die ektopische Expression des grün-fluoreszierenden Proteins	Dr. Martin Zeidler, unveröffentlicht

Für genetische Experimente wurden adulte Fliegen kurz mit Kohlendioxid betäubt, unter dem Binokular entsprechend ihrer phänotypischen Marker gesammelt und verkreuzt. Für die Arbeit häufig verwendete Kreuzungen sind mit einer stellvertretenden Bezeichnung in **Tabelle 11** aufgeführt:

Bezeichnung „Überexpression von...“	Genotyp
... <i>bnl</i>	UAS- <i>bnl</i> /w; +/+; <i>btl</i> -GAL4/+;
... <i>bnl</i> im Hintergrund <i>srf-lacZ</i> / mit Terminalzellmarker	UAS- <i>bnl</i> /w; <i>srf-lacZ</i> /+; <i>btl</i> -GAL4/+
... <i>bnl</i> im Mutantenhintergrund von <i>for</i>	UAS- <i>bnl</i> /w; <i>for</i> ⁰⁶⁸⁶⁰ / <i>for</i> ⁰⁶⁸⁶⁰ ; <i>btl</i> -GAL4/+
... <i>bnl</i> zusammen mit <i>globin</i>	UAS- <i>bnl</i> /w; UAS- <i>globin</i> (II)/+; <i>btl</i> -GAL4/+

Tabelle 11: Häufig verwendete genetische Hintergründe und ihre Bezeichnung im Text. Die jeweilige Bezeichnung ist nur sinngemäß angegeben.

4.1.2 Keimbahntransformation

Zur Generierung transgener Fliegen wurden maximal 30 min alte Embryonen des Genotyps *w*^{67c23} mit äquimolaren Mengen an zweifach Phenol/Chloroform-aufgereinigtem Expressionskonstrukt (jeweils auf Basis des Vektors pUAST-4, etwa 300 ng/μl) und Helferplasmid pUChsIIΔ2-3 (etwa 75 ng/μl) als zentrale Dienstleistung injiziert. Anschließend wurden die entwickelten Adulten mit dem Ausgangsstamm zurückgekreuzt (P-Generation), und keimbahntransformierte Tiere der F1-Generation anhand des Augenfarbenmarkers identifiziert. Die transgenen Tiere wurden nach Möglichkeit homozygot gehalten oder aber mittels Kreuzung gegen Tiere mit Balancierchromosomen genetisch stabilisiert.

4.1.3 Begasung mit N₂/O₂-Geschmischen

Für die Exposition von Embryonen in verschiedenen Gasgemischen, die wahlfrei aus N₂ und O₂ gemischt werden konnten, wurde ein Inkubator CB150 mit Regeloption der Firma Binder, Tuttlingen, benutzt.

4.2 Färbetechniken und Mikroskopie

Es wurden Techniken für die mikroskopische Analyse der embryonalen und larvalen Morphologie und Physiologie eingesetzt, die auf der spezifischen Anfärbung von Transkripten, Proteinen, apoptotischen Zellen und der endogene Sauerstoffkonzentration beruhen. Die Formulierung der nachfolgend benannten Standardpuffer sind der bekannten Literatur zu entnehmen (Sambrock et al., 1989).

4.2.1 *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung zur Detektion von Transkripten in totalpräparierten Embryonen wurde ursprünglich mit DNA-Sonden durchgeführt (Tautz und Pfeifle, 1989). Für die vorliegende Arbeit wurde ein stark modifiziertes Protokoll (Nina Gerlach, persönliche Mitteilung) für den Einsatz *in vitro*-transkribierter RNA-Sonden (siehe **Tabelle 12**) befolgt, dass die Anzahl der Arbeitsschritte erheblich verkürzt.

Sonde	DNA-Vorlage	Herkunft	Lin.	Pol.	Expression
<i>adh</i>		Dr. Ronald Kühnlein, unveröffentlicht			Fettkörper
<i>alp23B</i>	GH14433	MRC-Geneservice		Sp6	
<i>arginino-succinat-synthase</i>	LP06872	MRC-Geneservice, Cambridge, UK	EcoRI	Sp6	ubiquitär, Darm
<i>awd</i>	RH27794	Invitrogen, Karlsruhe		T3	Darm, Tracheen
<i>bnl</i>	PBS- <i>bnl</i>			T3	Tracheen
<i>cdc42</i>	RH14039	MRC-Geneservice			
<i>CG1114</i>	pBS- <i>CG1114</i>	diese Arbeit		T3	
<i>CG12447</i>	RE51076	MRC-Geneservice		T3	Tracheen
<i>CG1259</i>	RE66361	DGRC Indiana		T3	Tracheen
<i>CG14356</i>	RE49262	MRC-Geneservice		T3	Tracheen
<i>CG14414</i>	AT01764	MRC-Geneservice		T7	
<i>CG14569</i>	RE65906	MRC-Geneservice		T3	Tracheen?
<i>CG14622</i>	RE67944	MRC-Geneservice		T3	Tracheen
<i>CG15786</i>	RE24790	MRC-Geneservice		T3	Tracheen
<i>CG17052</i>	LD43683	MRC-Geneservice		Sp6	
<i>CG32548</i>	GH12946	MRC-Geneservice		Sp6	Tracheen
<i>CG33167</i>	GH12249	MRC-Geneservice		Sp6	Tracheen, VNS
<i>CG4089</i>	LD09343	MRC-Geneservice		T7	Tracheen, Hinterdarm
<i>CG4115</i>	RE18849	DGRC Indiana		T3	Tracheen
<i>CG5175</i>	LD09231	MRC-Geneservice		T7	
<i>CG6457</i>	RE57183	MRC-Geneservice		T3	Tracheen
<i>CG6718</i>	LD44515	MRC-Geneservice		Sp6	
<i>CG8312</i>	GH04568	MRC-Geneservice		Sp6	Tracheen
<i>CG8747</i>	RE22242	MRC-Geneservice		T3	Tracheen
<i>CG9070</i>	RE09259	MRC-Geneservice		T3	
<i>dhd</i>	LD23983	MRC-Geneservice	EcoRI	Sp6	
<i>dro5</i>	GH9576	MRC-Geneservice		Sp6	Fettkörper
<i>drs</i>	LP03851	MRC-Geneservice	EcoRI	Sp6	Fettkörper
<i>e</i>	GH24002	MRC-Geneservice	EcoRI	Sp6	
<i>exo70</i>	LD07014	MRC-Geneservice	EcoRI	Sp6	
<i>for</i>	LD46758	MRC-Geneservice	EcoRV	Sp6	Tracheen, VNS
<i>gasp</i>	LD05259	MRC-Geneservice		T7	

<i>globin</i>	pBS- <i>globin</i>	diese Arbeit		Sp6	Fettkörper, Tracheen
<i>gst3-1</i>	RE51415	MRC-Geneservice	XhoI	T3	Fettkörper
<i>IM1</i>	pBS- <i>CG18108</i>	diese Arbeit	BamHI	T3	Fettkörper
<i>IM10</i>	RH07321	MRC-Geneservice		T3	Fettkörper
<i>IM2</i>	pBS- <i>CG18106</i>	diese Arbeit	BamHI	T3	Fettkörper
<i>kkv</i>		Dr. Hans Merzendorfer, Universität Osnabrück			Tracheen
<i>lacZ</i>	pBS- <i>lacZ</i>	Herkunft unbekannt	NotI	T3	
<i>loco=CG17229</i>	GH08607	MRC-Geneservice		Sp6	Tracheen
<i>lola</i>	LD03274	MRC-Geneservice	XhoI	T7	VNS
<i>mesr3</i>	RE28259	MRC-Geneservice		T3	Tracheen, Fettkörper
<i>mipp-1</i>	RE51662	Invitrogen		T3	Tracheen
<i>nos</i>	RE15336	MRC-Geneservice			Mesoderm/VNS
<i>osk</i>	LD24944	MRC-Geneservice	EcoRV	Sp6	
<i>pfe</i>	GH07373	MRC-Geneservice		Sp6	
<i>pxt</i>	LD43147	MRC-Geneservice	EcoRV	Sp6	
<i>rala</i>	GH09576	MRC-Geneservice		Sp6	ubiquitär, Tracheen
<i>rel</i>	GH01881	MRC-Geneservice	EcoRI	Sp6	
<i>sima</i>	pBS- <i>sima</i>	diese Arbeit		T7	
<i>srf</i>	pBS- <i>srf</i>	diese Arbeit		T3	Terminalzellen
<i>srf</i>	RE17834	MRC-Geneservice			Terminalzellen
<i>tan</i>	LD10005	MRC-Geneservice		T7	
<i>trf</i>	RE61442	MRC-Geneservice		T3	
<i>trh</i>	RH17284	MRC-Geneservice	XhoI	T3	Tracheen
<i>trxt</i>	GH14562	MRC-Geneservice	EcoRV	Sp6	
<i>upd</i>		Dr. Martin Zeidler			früh segmental, Tracheen
<i>vvl</i>		Dr. Martin Zeidler			

Tabelle 12: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit benutzten RNA-Sonden für *in situ*-Hybridisierungen. Die Tabelle benennt den im Text benutzten Namen der Sonde, sowie deren Herkunft. Es kann sich dabei entweder um überlassene Sonden oder selbst generierte handeln. In letzterem Fall wird die DNA-Vorlage, deren Herkunft sowie das eventuell eingesetzte Enzym zur Linearisierung und die benutzte Polymerase für das Protokoll unter 4.4.3 beschrieben. Für eine Vielzahl von *in situ*-Hybridisierungen wurde technische Assistenz in Anspruch genommen.

Die Embryonen wurden zunächst von Methanol über eine 3-5schrittige Verdünnungsreihe in PBT (PBS mit 0,1% Tween-20; PBS: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) überführt und 2-3 mal 20 min unter Pufferwechsel gewaschen. Die Embryonen wurden dann etwa 10 s einer 50 µg/ml Proteinase K-Lösung in PBT ausgesetzt, der Puffer schnell 3-4 mal gewechselt und dann noch einmal für 20 min in 4% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert. Anschließend wurden die Embryonen zunächst 2-3 mal 10 min in PBT gewaschen, über einen Verdünnungsschritt in Prähybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC; SSC: Dinatriumcitrat-Puffer) überführt und abschließend kurz in Prähybridisierungspuffer gewaschen. Die Embryonen wurden dann in Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC, 200 µg/ml Heringssperma-DNA, 100 µg/ml Torula-RNA, 50 µg/ml Heparin) überführt und für ca. 1 h bei 65 °C inkubiert. Überstehender Puffer wurde weitgehend entfernt und eine oder zwei RNA-Sonden entsprechend jeweils etwa 1 ng/µl für die 12-16 h Hybridisierung hinzugegeben.

Das Entfernen überschüssiger Sonde erfolgte durch einmaliges Waschen der Embryonen mit Hybridisierungspuffer und zweimaliges Waschen mit Prähybridisierungspuffer bei 65 °C für jeweils 10-15 min. Die Embryonen wurden dann über einen Verdünnungsschritt in PBT überführt und 3-5 mal für 5-10 min in PBT gewaschen.

Die Detektion der markierten RNA/RNA-Hybride beruht auf einer Enzym-gekoppelten Immunreaktion und hängt ab von der Anzahl und der Markierung der eingesetzten RNA-Sonden (Digoxigenin, DIG, oder Fluorescein, FLUO) und von der gewünschten Mikroskoptechnik (konventionelle Lichtmikroskopie oder konfokale Laserscan-Mikroskopie):

- Der konventionelle Nachweis markierter Sonden erfolgte durch Inkubation für ca. 2 h mit einem anti-DIG- oder anti-FLUO-Antikörper, der an alkalische Phosphatase konjugiert ist (beide: Benutzung ca. 1:2000, aus Pferd, von Boehringer/Roche, Mannheim). Nach mehrmaligen Waschen in PBT wurden die Embryonen in einen alkalischen Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween-20) überführt, hierin 3 mal 5 min gewaschen und in 1 ml Puffer mit 3,5 µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat und 4,5 µl Nitroblautetrazolium gefärbt. Die Färbereaktion wurde nach 5-60 min durch mehrfaches Waschen in PBT gestoppt.
- Einzelfärbungen für die konfokale Mikroskopie erfolgten für beide Markierungstypen durch Inkubation für ca. 1 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper (anti-DIG-POD oder anti-FLUO-POD, beide: Benutzung ca. 1:2000, aus Schaf, von Roche). Nach mehrmaligen Waschen in PBT wurden die Embryonen dann abweichend von den Herstellerangaben für 20 min 1:75 in Amplifikationslösung mit *Tyramide-Signal-Amplifier*-gebundenem Biotin (TSA-Biotin) von NEN/Perkin Elmer, Rodgau, inkubiert und danach erneut in PBT gewaschen. Die Erkennung des Biotins und damit die Visualisierung der Sonde erfolgte durch Inkubation unter Lichtabschluss mit Streptavidin-Cyanine2 von Molecular Probes/Invitrogen für 1 h. Dies wurde gefolgt von mehrmaligen Waschen in PBT und der langsamen Überführung der Embryonen in Ethanol. Die Embryonen wurden dann auf Objektträger aufgetropft und nach Verdunsten des Ethanols in Benzoylbenzoat aufgenommen und eingebettet.
- Fluoreszenz-Doppelfärbungen erfolgten nach demselben Prinzip wie die Einzelfärbungen. Die Ergänzung bestand darin, dass nach der Amplifikation mit TSA-Biotin und dem Waschschritt die Peroxidase des ersten Antikörpers durch Aufkochen auf 70 °C für 15 min inaktiviert wurde. Anschließend wurde während der Bindung an Streptavidin-Cyanine2 auch der Antikörper gegen die zweite Sonde mit inkubiert. Nach dem Waschen wurde dieser direkt durch TSA-gekoppelten Cyanine3-Farbstoff von NEN/Perkin Elmer fluoreszent markiert. Optional bestand für den anti-DIG-Antikörper die Möglichkeit, ihn für eine weitere Signalverstärkung durch biotinylierten anti-Schaf-Antikörper (Benutzung ca. 1:500, aus Esel, Dianova,

Hamburg) erkennen zu lassen und daran mittels des Vectastain-ABC-Kits von Vector Laboratories/Alexis, Grünberg, die notwendige Peroxidase daran zu koppeln.

4.2.2 Immunfärbung

Für Immunfärbungen an totalpräparierten Embryonen zum Nachweis von immunreaktiven Epitopen wurde ein im Vergleich zur Erstveröffentlichung (Macdonald und Struhl, 1986) stark modifiziertes Protokoll eingesetzt.

Die Embryonen wurden zunächst von Methanol über eine 3-5schrittige Verdünnungsreihe in PBT überführt und 2-3 mal 20 min unter Pufferwechsel gewaschen. Der oder die primären Antikörper (siehe **Tabelle 13**) gegen das jeweilige endogene Epitop wurden nach Herstellerangabe oder empirischer Determination verdünnt (meist 1:20-1:200) und die Embryonen darin bei 4 °C für 12-16 h inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden entfernt und die Embryonen in PBT gewaschen, wobei 2x 20 min durch Beigabe von ca. 3% Serum aus Pferd oder Ziege geblockt wurde. Die Auswahl der sekundären Antikörper (siehe **Tabelle 13**) richtete sich nach den Spendertieren der primären Antikörper sowie der bevorzugten Färbetechnik. Diese wurde im Regelfall 1:500 in serumhaltigem PBT verdünnt und die Embryonen darin für 2 h inkubiert. Danach wurde mehrfach mit PBT gewaschen. Der Nachweis erfolgte nach der gewünschten Mikroskoptechnik:

- Für die konventionelle Färbung wurden bevorzugt sekundäre Antikörper mit Konjugation an alkalische Phosphatase gewählt, der Nachweis erfolgte analog zur Färbung bei den *in situ*-Hybridisierungen (4.2.1). Alternativ kamen auch biotinylierte Sekundärantikörper zum Einsatz. Der Nachweis erfolgte mit einem Zwischenschritt über das Vectastain-ABC-Kit. Die so an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase wurde nach Herstellerangaben in einer Farbreaktion von Diaminobenzidin in Wasserstoffperoxid mittels des *Sigma Fast*-Kits von Sigma-Aldrich, München, nachgewiesen.
- Färbungen für die konfokale Mikroskopie erfolgten durch den Einsatz von Alexa-Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern von Molecular Probes/Invitrogen, was einen schnellen und direkten Nachweis ohne Verstärkungsschritt ermöglichte. War eine Verstärkung des Signals gewünscht, so wurden zunächst biotinylierte Sekundärantikörper eingesetzt, die dann (a) über Streptavidin-gekoppelte Fluorophore von Molecular Probes/Invitrogen markiert wurden oder (b) analog zum Protokoll für *in situ*-Hybridisierungen (4.2.1) über das Vectastain-ABC-Kit den Einsatz TSA-gekoppelter Fluorophore von NEN/Perkin Elmer erlaubten.

Antikörper (evtl. Markierung von)	Benutzung, Herkunft	Referenz/Bezugsquelle
primäre Antikörper		
2A12 (Tracheenlumen)	1:15, monoklonal Maus	Manning und Krasnow, 1993; DSHB
anti- β -GALAKTOSIDASE	1:100, Maus oder Kaninchen	Promega, Mannheim; ICN Biomedicals, Eschwege; Cappel Laboratories, Durham, USA
anti-FASCICLIN II (Nervenzellen)	1:20, Maus	Fujita et al., 1982; DSHB
BP102 (Nervenzellen)	1:10, monoklonal Maus	Carney et al., 1997; DSHB
BP106 (Nervenzellen)	1:10, monoklonal Maus	Patel et al., 1987; DSHB
sekundäre Antikörper		
anti-Kaninchen, Biotin- oder alkalische Phosphatase-gekoppelt	1:500, Pferd	Vector Laboratories
anti-Maus, Biotin- oder alkalische Phosphatase-gekoppelt	1:500; Pferd	Vector Laboratories
anti-Maus, Alexa-Fluorophor-gekoppelt	1:200; Pferd	Molecular Probes/Invitrogen

Tabelle 13: In der vorliegenden Arbeit benutzte primäre und sekundäre Antikörper für Immunfärbungen. Angegeben werden der im Text benutzte Name, wenn zutreffend, die angefärbte Struktur, die im Regefall benutzte Verdünnung, sowie Informationen zur Herkunft und Bezugsquelle des Antikörpers. DSHB bezeichnet die akademische Sammlung *Developmental Studies Hybridoma Bank* der Universität Iowa, USA. Nicht erneut angegeben sind die Antikörper, welche für *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt wurden.

4.2.3 TUNEL-Test zum Nachweis apoptotischer Zellen

Der Nachweis von kontrolliertem Zelltod in totalpräparierten Embryonen erfolgte durch die Markierung von DNA-Einzelstrangbrüchen in apoptotischen Zellen. Dieser Test ist auch als TUNEL-Assay (für: terminal desoxyribosyl-transferase mediated dUTP nick end labelling; terminale Desoxyribosyltransferase vermittelte dUTP-Strangbruch-Markierung) bekannt. Hierfür wurde das *In Situ Cell Death Detection*-Kit von Boehringer/Roche nach stark modifizierten Protokoll angewandt.

Der erste Teil der TUNEL-Färbung wurde analog zur *in situ*-Hybridisierung (4.2.1) durchgeführt, bevor in den Prähybridisierungspuffer überführt wird. Stattdessen erfolgte die enzymatische Markierung mit der terminalen Transferase: Zunächst wurden die Embryonen 2-3x in Reaktionspuffer gewaschen. Dann wurden 30 μ l Reaktionsmix (Fluorescein-gekoppelte dUTP und Enzym) zu den Embryonen hinzugegeben, die man darin für 1-2 h bei 37 °C inkubieren ließ. Nach mehrfachem Waschen in PBT wurde dann analog zur *in situ*-Hybridisierung ein Antikörpernachweis gegen die Fluorescein-gekoppelten dUTP-Moleküle geführt.

4.2.4 Farbstoffapplikation durch Injektion oder Permeabilisierung

Eine Reihe physiologischer Reaktionen wurden durch spezifische Farbstoffe visualisiert, die hierzu in lebendige Embryonen injiziert wurden. Zunächst wurden Embryonen dechorionisiert, mittels eines Heptan-löslichen Klebstoffs auf einem Glasträger parallel ausgerichtet befestigt und anschließend von einer dünnen Schicht Voltalef 10S-Öl bedeckt. Zwei Systeme standen für die eigentliche Injektion zur Verfügung: Abteilungsintern wurden Embryonen auf einem Mikroskopkreuztisch unter einem

feststehenden 10fach-Objektiv ausgerichtet und mit einem Transjector 5246 von Eppendorf, Hamburg, unter Benutzung herstellerempfohlener steriler Nadeln vom Typ Femtotip Gold injiziert, wobei die Injektionsparameter empirisch variiert wurden. Die Nadel war mit einem Fixstativ befestigt und die Injektion erfolgte durch Bewegung des Kreutztischs. Für Versuche, die in der Abteilung für Zoophysiologie der Universität Münster durchgeführt wurden, stand ein technisch komplexeres Injektionssystem zur Verfügung: Die Injektionsnadel war mit einem elektronischen Mikromanipulator von Märzhäuser, Wetzlar, und mit einem Piezo-betriebenen Vortrieb versehen, und die Injektion erfolgte an einem Axiovert 100 von Carl Zeiss, Jena.

Eine Alternative zur Injektion von Farbstoffen war die Permeabilisierung der embryonalen Vitellinmembran durch organische Lösungsmittel wie Heptan oder Oktan und anschließende Diffusion der Farbstoffe (Strecker et al., 1994). Dazu wurden die dechorionisierten Embryonen zunächst in etwa 100 µl PBS oder PBT mit entsprechender Farbstoffbeimengung gegeben, die einen Tropfen in einem Uhrenglas bildeten. Hierzu wurden vorsichtig 200-500 µl des organischen Lösungsmittels gegeben, das sofort einen Ring um die wässrige Phase bildete, an der sich die Embryonen zur gleichzeitigen Berührung beider Phasen ausrichteten. Direkt im Anschluss wurde das Lösungsmittel mit einer Glaskapillare abgezogen und sobald nur noch die wässrige Phase übrig war, wurden weitere 100-500 µl Farbstofflösung hinzugegeben. Nach ca. 30 min wurden die Embryonen unter dem Binokular auf den Färbeerfolg hin überprüft.

4.2.5 Konventionelle Mikroskopie

Konventionelle Mikroskopie im sichtbaren Licht wurde an einem Mikroskop vom Typ Axiophot von Carl Zeiss mit Normarski-Optik durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit einer digitalen Videokamera ProgRes-3012 von Kontron, München. Für die Analyse fluoreszent markierter Proben wurde ein Mikroskop Axioskop 2 Mot von Carl Zeiss eingesetzt, an dem für Bilddokumentation eine zugehörige digitale Videokamera AxioCam zur Verfügung stand. Die Bildaufnahme erfolgte an beiden Systemen mit Adobe Photoshop v5 auf einem Apple-Computersystem, weitere Bildverarbeitung wurde mit dem Programm IrfanView v3.85 auf einem PC-System durchgeführt.

4.2.6 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Die konfokale Laserscan-Mikroskopie wurde an einer konfektionierten Kompletteneinheit durchgeführt, dem Dreikanalsystem TCS SP2 von Leica, Heidelberg, bestehend aus Mikroskop, Konfokaleinheit und Computersystem. Für die Bearbeitung der digitalen Bilddaten wurde zur Regulation von Helligkeit und Kontrast IrfanView v3.85 eingesetzt. Dreidimensionale Rekonstruktionen aus konfokalen Schnittserien und deren Projektion sowie die quantitative Bildauswertung erfolgten mit dem Programmpaket Amira v3 von TGS, Merignac, Frankreich.

4.2.7 Optophysiologie

Die *in vivo*-Bestimmung von Sauerstoffkonzentrationen im Embryo wurde mit einer selbstgebauten Messanordnung (Pirow et al., 1999; Pirow et al., 2004) unter Anleitung von Dr. Ralph Pirow am Institut für Zoophysiologie der Universität Münster durchgeführt. Das Messprinzip basiert auf der Bestimmung der Sauerstoff-abhängigen Reduzierung der Phosphoreszenzdauer des Farbstoffs Oxyphor R2 (Dunphy et al., 2002).

Die Untersuchungen wurden an einem inversen Mikroskop Axiovert 100 von Carl Zeiss gemacht, das durch folgende Komponenten ergänzt und modifiziert war: Zusätzlich zur Mikroskoplampe konnte das Licht einer 525 nm 2 mW Leuchtdiode (LED) von Rhoitner Lasertechnik, Wien, Österreich, im Zentrum des Sehfeldes als Lichtpunkt zugeschaltet werden. Am Kameraanschluss war ein *Photomultiplier* H5783-01 von Hamamatsu Photonics, Herrsching, angebracht, dessen Signal über einen Lock-In-Verstärker mit digitalem Signalprozessor SR830 von Stanford Research Systems, Sunnyvale, USA, verstärkt wurde. Die LED wurde über einem Sinusgenerator FGG07 von Conrad Electronic, Hirschau, gespeist, dessen Signal zusammen mit dem Signal des *Photomultipliers* auf verschiedenen Kanälen eines Oszilloskops HM305 von Hameg, Mainhausen, sichtbar gemacht wurden. Die Phasenverschiebung der Signale sowie die Stärke des *Photomultiplier*-Signals bei 690 nm wurden entweder mit einem separaten Schreiber Servogor 122DC von Goerz Elektrik, Wien, Österreich, oder über eine entsprechende Analog/Digital-Wandlerkarte in einem PC-System dokumentiert. Alle Untersuchungen erfolgten mit einer temperierten Messkammer, in der mittels eines Wasserbads und einer Gasmischpumpe von Wösthoff, Bochum eine konstante Temperatur von 25 °C und diskret veränderbare Sauerstoffkonzentrationen herrschten.

Embryonen wurden zunächst mit einer Lösung aus 20 mg/ml Oxyphor R2, 25 mg/ml bovinem Albuminserum, 120 mM NaCl und einer kleinen Beimengung Gegenfarbstoff injiziert. Ein einzelner Embryo wurde in das Messfeld gebracht, sodass die LED den Messbereich vollständig ausleuchtete. Die Messung wurde mit einem Sinussignal von 750 Hz und nur mit Beleuchtung durch die LED durchgeführt. Die Phasenverschiebung wurde dann bei abnehmender Sauerstoffkonzentration zwischen 21% und 0% bestimmt, aus der man unter Anwendung der Stern-Vollmer-Gleichung im Vergleich zu Referenzmessungen den internen pO_2 der Embryonen bestimmen kann. Die Berechnungen erfolgten mit Jandel SigmaPlot v7.

4.3 **Genexpressionsanalysen mit dem Affymetrix GeneChip-System**

Für die genomweite Transkriptomanalyse kam das *GeneChip*-System von Affymetrix, Santa Clara, USA, zum Einsatz. Das Messprinzip beruht auf einem genau definierten Protokoll (Affymetrix, 2002b), das eine Reihe teilweise herstelllerspezifischer Termini (siehe **Tabelle 14**) beinhaltet, und soll kurz skizziert werden: Die Aufbereitung der RNA-Probe erfolgt durch das Umschreiben und somit die lineare Amplifikation aller mRNAs in immunogen-markierte cRNAs. Diese wird fragmentiert und

dabei für die Hybridisierung an kurze Oligonukleotide vorbereitet. Diese sogenannten *Probes* sind durch eine patentierte photolithographische Technik direkt auf dem *GeneChip* synthetisiert worden, und jedes auf dem *Chip* vertretene Gen besitzt ein eigenes *Probeset*. Die Hybridisierung erfolgt in einem Hybridisierungssofen, der über eine spezielle Halterung für die *GeneChips* verfügt. Nach der Hybridisierung wird der *Chip* in einer Waschstation mit zwei verschiedenen Puffern und bei wechselnder Temperatur nach einem definierten Programm gewaschen. Hier erfolgt auch eine Immunfärbung mit Fluorophor-gekoppeltem Antikörper, der gegen die markierten cRNAs gerichtet ist. Der *Chip* wird danach in ein spezielles Lesegerät gesteckt, das konfokal mit einem Laser die etwa $1,64 \text{ cm}^2$ große Oberfläche des *GeneChip* in $9 \mu\text{m}^2$ großen Blöcken abtastet und daraus ein digitales Bild erstellt. Mittels der mitgelieferten Software kann dann mit einem PC-System die relative Intensität und somit das Hybridisierungssignal für jedes *Probeset* bestimmt werden.

Begriff	Übersetzung	Erklärung
<i>GeneChip</i> , auch: <i>Chip</i> , <i>Microarray</i> , <i>Array</i>	Gen-Chip, Mikrofeld, Feld	Plattform, auf der die Sonden aufgebracht sind
Probe	Sonde	ein etwa 25 bp langes Oligonukleotid komplementär zur RNA-Probe, die darauf hybridisiert wird
ProbeSet	Sondensatz	Gesamtheit der Sonden pro Gen bzw. EST, meist etwa 14, die im 1 kb langen 3'-Bereich der Zielsequenz liegen
cRNA, <i>copy</i> RNA	RNA-Kopie	durch <i>in vitro</i> -Transkription linear amplifizierte RNA

Tabelle 14: Im Zusammenhang mit der *GeneChip*-Technologie häufig benutzte Fachtermini. Die Begriffe stammen aus dem Englischen und gelten teilweise auch für andere Hersteller und/oder Methoden. Es ist die wörtliche Übersetzung sowie die ungefähre Bedeutung mitaufgelistet.

Der *Drosophila GeneChip* verfügt über *Probesets* für etwa 13500 putative mRNA-Transkripte, die aus der ersten Version (*Release 1*) der Genomsequenz im August 2000 vorhergesagt wurden. Davon entsprachen über 8000 *Probesets* tatsächlichen ESTs oder cDNA-Klonen, weitere 4000 wurden mittels computergestützter Vorhersagen putativer Gene gestaltet.

4.3.1 Probenaufbereitung aus embryonalem Gewebe

Embryonen des gewünschten Genotyps wurden dechorioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Präparation wurden etwa 1000-3000 Embryonen aus verschiedenen Kollektionen in flüssigem Stickstoff gemeinsam gemörsert, das pulverisierte Material mittels einer QiaShredder-Säule von Qiagen homogenisiert und die RNA anschließend mit dem *RNeasy Mini-Kit* von Qiagen mit einem Elutionsvolumen von $100 \mu\text{l}$ isoliert. Die Ausbeute lag hier meist zwischen $15\text{-}45 \mu\text{g}$, die Absorptionsspektroskopie zeigte einen $\text{Ratio } \text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}} > 2$. Zur Überprüfung erfolgte eine visuelle Kontrolle der isolierten Gesamt-RNA durch native Gelelektrophorese.

Für die weitere Präparation wurde jeweils $7,5 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA eingesetzt. Die Umschreibung in cDNA erfolgte mit dem von Affymetrix empfohlenen *SuperScript Choice System* und anderen Enzymen von Invitrogen nach Protokollangaben. Der dafür notwendige T7-(dT)₂₄-Primer mit der

Sequenz 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3' wurde von MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert und dort per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie aufgereinigt. Die cDNA wurde anschließend mit dem *Sample-Cleanup-Module*-Kit von Affymetrix über eine Affinitätssäule aufgereinigt.

Ein halbes Elutionsvolumen der vorangegangenen Reaktion wurde für die *in vitro*-Transkription mit T7-Polymerase dem *Enzo BioArray HighYield RNA Transcript Labeling*-Kit von Affymetrix eingesetzt, die nach etwa 4 h beendet wurde. Dieser Schritt diente sowohl der linearen Amplifikation des Materials als auch dem Einbau von Biotin-markierten Nukleotiden. Nach dem Aufreinigen der cRNA mit dem *RNeasy Mini*-Kit lag die photometrisch bestimmte Ausbeute dieser Reaktion meist zwischen 20-50 µg RNA. Die cRNA wurde dann mit dem entsprechenden Puffer aus dem *Sample-Cleanup-Module* der Fragmentierung ausgesetzt und bis zur Hybridisierung bei -80 °C gelagert. Eine Überprüfung der cRNA vor und nach der Fragmentierung erfolgte durch native Gelelektrophorese.

4.3.2 Hybridisierung, Wasch- und Färbeschritte und Bilderfassung

Alle für die weiteren Schritte benötigten Puffer und Lösungen wurden nach Angaben von Affymetrix hergestellt, die dafür notwendigen Chemikalien von den empfohlenen Herstellern bezogen. Für die Hybridisierung wurden 15 µg cRNA nach Protokoll mit Kontroll-Oligonukleotid B2 und Hybridisierungskontrollen bioB, bioC, bioD und creI von Affymetrix in 300 µl Hybridisierungspuffer gelöst. Die Applikation der Hybridisierungslösung auf den *Chip* erfolgte nach Herstellerangaben, die Hybridisierung wurde im zum Komplettsystem gehörenden Ofen für 16 h bei 45 °C durchgeführt.

Nach der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung zurückgewonnen und zur eventuellen Wiederholung bei -80 °C gelagert. Der *Chip* wurde in der ebenfalls zum System gehörenden Waschstation *Fluidics Station 400* mit dem Programm EukGE-WS2v4 gewaschen und gefärbt. Dies beinhaltet nach dem eigentlichen Waschen die Behandlung mit Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE), dann die Amplifikation mit biotinyliertem anti-Streptavidin-Antikörper sowie eine weitere Färbung mit SAPE. Dieser Schritt wurde abweichend vom Standardprotokoll mit einer zweiten Amplifikation ergänzt.

Die gefärbten *GeneChips* wurden dann in das zugehörige Lesegerät *GeneArray Scanner* eingelegt und mit einem Parametersatz aus Anregung 488 nm, Emission 570 nm, Abtastgröße 3 µm² und Mittelung zweier Abtastvorgängen mit je 16 Bit Farbtiefe pro Bild digitalisiert. Die Bilddatei im TIF-Format (für: *tagged image file*, markierte Bilddatei) stellt die Rohdaten des Experiments dar.

4.3.3 Computergestützte Analysen von Microarray-Daten

Die Analyse von *Microarray*-Daten lässt sich grob in drei Phasen unterteilen, nämlich (a) die Errechnung eines relativen Expressionswerts für jedes *Probeset* aus den Bilddaten, (b) den Vergleich zwischen Experimenten und die Identifikation differentiell exprimierter Gene, und (c) die Gruppierung ähnlich regulierter Gene in funktionelle Gruppen und biologische Interpretation.

Expressionswertbestimmung: Der relative Expressionswert eines *Probesets* kann mittels der Lageinformation über die einzelnen *Probes* auf dem Chip aus deren Helligkeitswert in der Bilddatei errechnet werden. Hier wurden die Verfahren der Microarray Suite v5 (MASv5) von Affymetrix sowie ein modellbasiertes Verfahren (Naef et al., 2002) gewählt, es existieren aber auch alternative Algorithmen, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden kann (zur Übersicht: Quackenbush, 2002). Es sei vorweg gesagt, dass der Zahlenwert nur eine relative Größe ist und keinerlei Aussage über die absolute Transkriptmenge oder Kopienzahl zulässt.

Die MASv5-Software teilt in dieser ersten Analysestufe das Bild in die verschiedenen *Probes* auf, wobei sie sich am Helligkeitsmuster der Kontrollnukleotide orientiert. Sodann wird aus den 2% schwächsten *Probes* ein Hintergrundsignal berechnet, um welches die weiteren Messwerte korrigiert werden. Die Werte werden zur Basis 2 logarithmiert, um die Variation auf allen Intensitätsstufen konstant zu halten. Dann werden die Helligkeitswerte aller *Probes* so skaliert, dass der Durchschnitt aller einen vorbestimmbaren Wert hat. Für diese globale Skalierung wurde der Parameter für alle Experimente auf 500 gesetzt. Zusätzliche Normalisierung wurde nicht durchgeführt.

Am Ende der Expressionswertbestimmung erhält man eine Tabelle, die für alle *Probesets* unter anderem den relativen Expressionswert (den sogenannten *signal log*) enthält, eine Abschätzung, ob das betreffende Transkript tatsächlich exprimiert ist, sowie eine statistische Beurteilung (p-Wert) über die Datengüte. Da die beiden letzteren aus verschiedenen Gründen für die Dateninterpretation weitgehend ignoriert wurden (siehe Diskussion), wird ihre Berechnung hier nicht weiter erläutert.

Das modellbasierte Verfahren erweitert den Ansatz von Affymetrix durch eine geringere Empfindlichkeit gegenüber statistischen Schwankungen in der Signalintensität, die von hauptsächlich von ungünstigen Hybridisierungseigenschaften einzelner *Probes* herrühren. Dafür wird aus der Intensitätsverteilung sowohl der völlig komplementären *Perfect Match-Probes* als auch der *Mismatch-Probes* mit einem definierten Basenaustausch in der Mitte des Oligonukleotids eine Verteilung modelliert, die als Grundlage für die Entfernung solcher *Probes* aus dem Gesamtsignal des *Probesets* dient.

Identifikation differentiell exprimierter Gene mit MASv5 oder frei verfügbaren Skripten: Der grundsätzliche Vergleich zwischen zwei *Chips* wurde mit MASv5 oder frei verfügbaren Skripten (Naef et al., 2002) durchgeführt. Zunächst wurden die Expressionswerte der respektiven Referenz berechnet. Für die Berechnung der Expressionswerte der Probe wurde für sie als Basislinie der Bezug zur Referenz angegeben. Dadurch erhält man eine Datentabelle, die neben den Expressionswerten beider Experimente auch den Ratio der Signale (den sogenannten *signal log ratio*) sowie eine Bewertung und Wahrscheinlichkeit enthält, ob das *Probeset* tatsächlich differentiell exprimiert ist.

t-Test-Statistik, Komponenten-, Varianz- und Signifikanzanalyse: Sobald mehr als zwei *Chips* miteinander verglichen werden und Replikate verfügbar sind, bietet MASv5 nur wenige und

kompliziert zu bedienende Optionen. Aus diesem Grunde wurde die weitere Identifikation differentiell exprimierter Transkripte mit alternativen Programmen betrieben.

Für die grundsätzliche Beurteilungen von *Probesets* verschiedener *Chips* wurde die t-Test-Statistik von Microsoft Excel eingesetzt, hier ließen sich auch einfache Filter definieren. Alternativ wurde das R-Paket 1.9 (<http://www.r-project.org>) eingesetzt, das eine Plattform für die Bibliothek BioConductor (<http://www.bioconductor.org>) darstellt und somit viele Funktionen zur Auswertung der Daten bereitstellt.

Die Komponentenanalyse (*component analysis*, CA, und *principal component analysis*, PCA) diente zur Betrachtung der Verschiedenheit der Experimente. Mittels einseitiger Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) wurden Transkripte identifiziert, die bei Betrachtung von drei verschiedenen Gruppen in wenigstens einer signifikant anders reguliert waren. Die Verfahren CA, PCA und ANOVA wurden mit dem Programmpaket Genesis v1.4 (Sturn et al., 2002) durchgeführt.

Die t-Test-Statistik geht davon aus, dass die Werte einer Gruppe normalverteilt sind und beurteilt demnach ihre Verschiedenheit. Tatsächlich ist die Normalverteilung aber eine idealisierte Annahme. Aus diesem Grunde gibt es sogenannte *Bootstrap*-Verfahren, die basierend auf den Messdaten rechnerisch eine sie enthaltende Normalverteilung generieren und somit eruieren, ob zwischen zwei Gruppen ein signifikanter Unterschied besteht. Diese Verfahren sind weniger anfällig gegenüber statistischen Schwankungen als t-Test-Statistik. Eine Implementierung dieses Verfahrens findet sich in der Signifikanzanalyse SAM (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>) wieder, die als Modul für Microsoft Excel benutzt werden kann und diverse publizierte Algorithmen (Tusher et al., 2001) anwendet.

Gruppierungsverfahren: Während die bisher vorgestellten Methoden auf die Identifikation einzelner differentiell regulierter Gene zielen, dienen Gruppierungsverfahren (eingedeutscht: *Cluster*-Verfahren) zur Gruppeneinteilung ähnlich regulierter Gene. Man kann somit versuchen, aus der Gesamtheit der Gene regulatorische Tendenzen zu ermitteln. Es existieren eine Reihe von Programmen, für die vorliegende Arbeit wurde der Quasistandard Cluster/TreeView (Eisen et al., 1998) benutzt.

Weitere Analysen wurden mit selbstentwickelten Programmen durchgeführt, die mit Object Pascal unter Borland Delphi v6 Professionell geschrieben wurden (siehe Ergebnisse). Externe Programmelemente waren die Datenbank-Komponente WinZeos (<http://zeoslib.sourceforge.net>), die Visualisierungsroutine TTreeView (<http://www.lischke-online.de/VirtualTreeview/VT.php>) und TRegExpr (<http://anso.virtualave.net/RegExpE>) für reguläre Ausdrücke. Die Visualisierung von Interaktionsgraphen erfolgte mit Osprey v1.2 (Breitkreutz et al., 2003). Als Datenbanksystem wurde MySQL 3.23.47-nt (<http://www.mysql.com>) benutzt.

4.4 Molekular- und mikrobiologische Arbeitstechniken

In diesem Abschnitt sind Standardmethoden der Molekular- und Mikrobiologie zusammengefasst, die für Durchführung einiger Experimente notwendig waren.

4.4.1 Klonierungen

Die für die Durchführung der vorliegenden Arbeit notwendigen Konstrukte (siehe **Tabelle 15**) wurden nach Möglichkeit dadurch generiert, dass die gewünschten DNA-Abschnitte durch präparativen Restriktionsverdau aus cDNA-Klonen isoliert und anschließend in den Zielvektor subkloniert wurden. Die Amplifikation per PCR (für: *polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion) ist deutlich fehleranfälliger und wurde daher nur für *de novo*-Klonierungen eingesetzt, wenn entsprechende cDNA-Klone nicht verfügbar waren oder nur über ungeeignete Restriktionsschnittstellen verfügten. Nach der Ligation in den Zielvektor wurde die DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen des Stammes *E. coli* DH5 α , verfügbar von New England Biolabs, Frankfurt, transformiert. Der Erfolg der Ligation und Transformation wurde durch PCR-Diagnostik überprüft. Quantitative Mengen wurden mit Kit-Systemen von Qiagen, Hilden, und Promega isoliert. Alle Plasmide wurden nach der Generierung mit einem Sequenziergerät ABI Prism 377/96 von Perkin Elmer durch einen abteilungsinternen Dienstleister sequenziert.

Drosophila cDNA-Klone wurden von MRC-Geneservice, Cambridge, UK, bezogen. Oligonukleotide für die PCR („*Primer*“, siehe **Tabelle 16**) stammten von MWG-Biotech. Für präparative PCR wurde die *Advantage Taq*-Polymerase von Clontech, Heidelberg, eingesetzt und für diagnostische PCR das Mastermix-Hotstart-Kit von Qiagen.

Tabelle 15: Die für die vorliegende Arbeit generierten Konstrukte und ihre Herstellung. Die Vektoren bezeichnen: pUAST(-4): pCaSpeR-3, Vektor zur Keimbahntransformation, abteilungsintern verfügbar; pBS: pBluescript KS (+/-), Klonierungsvektor, Stratagene; pRSETa, Expressionsvektor mit N-terminalem 6fach Histidin-Tag, Invitrogen.

Konstrukt	Präparation
Vektoren für die Generierung transgener Fliegen	
pUAST- <i>globin</i>	Der offene Leserahmen von <i>globin</i> wurde aus embryonaler cDNA mittels der <i>Primer</i> glob-5'-EcoRI und glob-3'-XhoI amplifiziert und das aufgereinigte Fragment nach Verdau mit den Enzymen EcoRI und XhoI in den entsprechend geschnittenen Vektor kloniert.
pUAST- <i>nos</i>	Ein 4,2 kb großes Fragment, dass den offenen Leserahmen des Gens für Stickstoffmonoxid-Synthase umfasst, wurde durch Verdau des cDNA-Klons RE15336 mit den Enzymen KpnI und XbaI erhalten und in entsprechend geschnittenen Vektor subkloniert.

pUAST- <i>nos</i> ^{RNAi}	Ein 400 bp großes Fragment, das für die Häm-bindende Domäne der Stickstoffmonoxid-Synthase kodiert, wurde für die Inaktivierung durch interferierende RNA ausgewählt. Die beiden Fragmente, die <i>in vivo</i> die antiparallele Faltung der Transkripte erlauben sollten, wurden per PCR mittels der <i>Primer</i> RNAi-NOS-5'-NotI und RNAi-NOS-3'-XhoI für den <i>sense</i> -Strang und RNAi-NOS-3'-KpnI und RNAi-NOS-5'-XbaI für den <i>antisense</i> -Strang aus dem cDNA-Klon RE15336 generiert. Die Fragmente wurden mit NotI und XhoI bzw. KpnI und XbaI verdaut. Zunächst wurde das <i>sense</i> -Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor kloniert. Die Plasmid-DNA eines Ausgangsklons wurde sodann mit den Enzymen KpnI und XbaI verdaut und das zweite Fragment eingefügt. Die Transformation erfolgte in diesem Fall in Bakterien des Stammes <i>E. coli</i> SURE von Stratagene, Heidelberg, in denen die endogene Elimination von Duplex-DNA seltener als in anderen Stämmen ist.
pUAST- <i>sima</i>	Für die Klonierung von <i>sima</i> in pUAST stand der Vektor pAct- <i>sima</i> (Steve Crews, Universität Chapel Hill, NC, USA, unveröffentlicht) mit dem 4,5 kb großen offenen Leserahmen als Donor zur Verfügung. Durch eine einzige in pAct- <i>sima</i> übrig gebliebene Schnittstelle ergab sich, dass zunächst die cDNA durch Verdau mit XhoI vom Ausgangsvektor isoliert wurde. Dabei wurde aber die cDNA zusätzlich in zwei Fragmente von 1,8 und 2,7 kb zerteilt. Dann wurde pBS mit ApaI linearisiert, mit T4 Polymerase einer Auffüllreaktion unterzogen. Sodann wurde der Vektor mit XhoI verdaut. Das 1,8 kb große Fragment wurde dann an den geschnittenen Vektor ligiert und ebenfalls mit T4 Polymerase aufgefüllt. Nach Transformation wurde ein Klon gefunden, in dem sich die vektorinterne Schnittstelle für KpnI vor dem 5'-Bereich des offenen Leserahmens von <i>sima</i> befand. Dies wurde durch Verdau mit den Enzymen KpnI und XhoI isoliert. Das 2,7 kb große Fragment wurde zunächst nach analoger Strategie in pBS zwischen die Schnittstellen der Enzyme XhoI und EcoRV kloniert. Die Plasmid-DNA eines Klons, in dem die XhoI-Schnittstelle des Vektors im 5'-Bereich der cDNA lag, wurde mit KpnI und XhoI verdaut und das 1,8 kb große Fragment in diesen Vektor kloniert. Es entstand somit ein Ausgangsvektor pBS mit der vollständigen cDNA von <i>sima</i> zwischen den Schnittstellen KpnI und XbaI. Der Verdau mit diesen Enzymen erlaubte die Isolation der cDNA und eine direkte gerichtete Klonierung in pUAST.
pUAST- <i>srf</i>	Der offene Leserahmen von <i>dsrf</i> wurde aus embryonaler cDNA mittels der <i>Primer</i> pUAST-srf-5'-EcoRI und pUAST-srf-3'-XhoI amplifiziert und das aufgereinigte Fragment mit den Enzymen EcoRI und XhoI geschnitten. Das Fragment wurde danach in entsprechend geschnittenen Vektor kloniert.
Vektoren als Vorlage für die in vitro-Transkription von RNA	
pBS-CG18108 (IM1) pBS-CG18107 pBS-CG18106 (IM2) pBS-CG16844 (IM3) pBS-CG15065 pBS-CG15068 pBS-CG15231 (IM4)	Alle Gene der putativen Immunregion auf Chromosom II wurden nach derselben Strategie per PCR mit den entsprechenden <i>Primern</i> CGxxxxx-5'-BamHI und CGxxxxx-3'-EcoRI aus embryonaler cDNA (Embryonen von <i>btl</i> -GAL4 x UAS- <i>bnl</i>) amplifiziert und nach Verdau mit den Enzymen BamHI und EcoRI in entsprechend geschnittenen Vektor kloniert.
pBS-CG1114 (<i>fatiga</i>)	Das Gen CG1114 wurde per PCR mittels der <i>Primer</i> CG1114-5'-XhoI und CG1114-3'-HindIII aus embryonaler cDNA amplifiziert. Das aufgereinigte Fragment wurde mit den Enzymen XhoI und HindIII verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor kloniert.
pBS- <i>globin</i>	Der offene Leserahmen von <i>globin</i> wurde aus embryonaler cDNA mittels der <i>Primer</i> glob-5'-EcoRI und glob-3'-XhoI amplifiziert und das aufgereinigte Fragment nach Verdau mit den Enzymen EcoRI und XhoI in den entsprechend geschnittenen Vektor kloniert.
pBS- <i>srf</i>	Der offene Leserahmen von <i>dsrf</i> wurde aus embryonaler cDNA mittels der <i>Primer</i> pUAST-srf-5'-EcoRI und pUAST-srf-3'-XhoI amplifiziert und das aufgereinigte Fragment mit den Enzymen EcoRI und XhoI geschnitten. Das Fragment wurde danach in entsprechend geschnittenen Vektor kloniert.
Vektoren für die bakterielle Proteinexpression	
pRSETa-CGxxxxx	Die cDNA-Sequenzen der putativen Immunregion wurden aus pBS mittels BamHI und EcoRI herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pRSETa subkloniert.

Tabelle 16: Benutzte Oligonukleotide für die Klonierungen. Es werden nur die jeweiligen Sets für *de novo*-Amplifikationen aus cDNA angegeben; im Vektor liegende *Primer* und solche für Sequenzierungen werden aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgespart. Die Schnittstellen der im Text angegebenen Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5' > 3')
glob-5'-EcoRI	CAGAATTC <u>CGGAGC</u> ATAAACATGAAC
glob-3'-XhoI	CACTCGAGCTACTTGGCGTTGCCG
RNAi-NOS-5'-NotI	ATAAGAATGCGCCGCCATCGATAAAGCGTACATCATC
RNAi-NOS-3'-XhoI	CCGCTCGAGCTCTGTAAACTCCACATTCATG
RNAi-NOS-3'-KpnI	GGGGTACCCTCTGTAAACTCCACATTCATG
RNAi-NOS-5'-XbaI	GCTCTAGACATCGATAAAGCGTACATCATC
pUAST-srf-5'-EcoRI	CAGAATTCATGGATCCGACGCGAG
pUAST-srf-3'-XhoI	CACTCGAGCTAATCGAACTCCTG
CG18108-5'	CAGGATCCATGAAATCTTCTCAGTC
CG18108-3'	CAGAATTCCTACTTGCCACCGTGGACATT
CG18107-5'	CAGGATCCATGCGATTCTTTGCAATC
CG18107-3'	CAGAATTCCTATTTGCCACCACGAACATT
CG18106-5'	CAGGATCCATGAAGTTCTTCTCAGTC
CG18106-3'	CAGAATTCCTACTTTCCACCGTGCACATT
CG16844-5'	CAGGATCCATGAAATTCCTATCACTC
CG16844-3'	CAGAATTCCTAGGCCCTCACATTGCAGAC
CG15065-5'	CAGGATCCATGAAGTGGATGTCCTTG
CG15065-3'	CAGAATTCCTAGCCTCCGCGAACATTACA
CG15068-5'	CAGGATCCATGAAGCTGCTCTCGATT
CG15068-3'	CAGAATTCCTAATCGCCGCGTATATTGCA
CG15231-5'	CAGGATCCATGAAGTTCTTCCAAGCC
CG15231-3'	CAGAATTCCTAACCAGTACGAATGTACTG
CG1114-5'-XhoI	CGCCTCGAGGCTGTCTCAAGAGTAATAGAGTTC
CG1114-3'-HindIII	CCCAAGCTTAAGGAGCTTTGATTAACTTTCGCAAT

4.4.2 Zwei-Hybrid-Untersuchungen

Für die Identifikation von Proteininteraktionspartnern wurde eine Zwei-Hybrid-Strategie (Fields und Song, 1989) unter Anwendung des *MatchMaker LexA Two-Hybrid-System-Kits* von Clontech eingesetzt. Es handelt sich dabei die ursprüngliche Variante der Strategie, bei der die DNA-bindende Domäne eines Transkriptionsfaktors (Lex A aus *Saccharomyces spec.*) durch die Interaktion etwaiger Fusionsproteine in die Nähe der aktivierenden Domäne gebracht werden muss, um transkriptionell in den Metabolismus für Aminosäuren einzugreifen und somit der Hefezelle ein Wachsen auf Mangelnährmedium zu ermöglichen. Als Bibliothek wurde die von Clontech verfügbare *MatchMaker LexA Drosophila Library* im Vektor pB42AD verwendet, als Köder der Vektor pGilda-dVHL (Adryan, 2000). Transformation, Anzucht und Selektion der Klone erfolgte nach Anweisungen des Herstellers.

Die Überprüfung der Interaktion erfolgte nach einem Protokoll durch Koimmunoprecipitation (Ko-IP) direkt aus Hefeextrakt (Dr. Vincent Dammai, Medical University of South Carolina, USA, unveröffentlicht). Dafür wurden die Klone zunächst in 5 ml Selektionsmedium bis zu einer OD_{600 nm} von 1,5 angezogen. Die Zellen wurden dann bei 4×10^3 g pelletiert und in 1 ml Medium gewaschen.

Das Zellpellet wurde dann in einem Puffer aus 100 mM Tris-HCl (pH 9,0) und 10 mM Dithiothreitol gelöst und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut in sterilem Medium gewaschen. Das Pellet wurde dann in 400 µl Ko-IP-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM NaCl, 10% v/v Glycerin) und 100 µl 5x-Protease-Inhibitor-Cocktail von Boehringer/Roche gelöst und 3 mal 15 sec mit einem Ultraschallpuls aufgeschlossen. Durch Zentrifugation wurde das Lysat bei 4 °C abisoliert. Zu 100 µl Lysat wurden 100 µl 5x-Protease-Inhibitor-Cocktail, 250 µl 2x-Ko-IP-Puffer und 50 µl Protein A-Agarose (50%ig in Ko-IP-Puffer) von BioRad, München, zur Präabsorption gegeben. Das Lysat wurde für 1 h bei 4 °C inkubiert, durch Zentrifugation von der Agarose gereinigt und mit 2 µl 0,1 g/ml anti-LexA-Antikörper von Clontech versetzt. Diese Lösung wurde 12-16 h bei 4 °C inkubiert, mit 80 µl Protein A-Agarose versetzt, und erneut für 2-3 h inkubiert. Zuletzt wurde die Agarose pelletiert und 3x in eiskaltem Ko-IP-Puffer gewaschen, bevor sie in 60 µl Probenpuffer gelöst wurde. Davon wurden 20 µl für die Western-Analyse mit anti-LexA- und anti-HA-Antikörper (für die HA-Markierung der Bibliotheksproteine) von Clontech eingesetzt.

4.4.3 in vitro-Transkription

Antisense-Sonden für *in situ*-Hybridisierungen wurden mit dem DIG-RNA-Labeling-Kit von Boehringer/Roche hergestellt. Wahlweise wurde anstelle der mitgelieferten Digoxigenin-markierten dNTP-Mixtur eine Fluorescein-markierte dNTP-Mixtur von Boehringer/Roche für die Reaktion eingesetzt, um bei Doppelfärbungen verschiedene Detektionssysteme einsetzen zu können. Dafür wurde die DNA-Vorlage nach der eigentlichen Transkriptvorlage mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert. Lange Transkripte >800 kb wurden durch Aufkochen in Carbonat-Puffer (2x-Puffer: 120 mM Na₂CO₃, 80 mM NaHCO₃ (pH 10,2) bei 37 °C für 20-30 min fragmentiert. Nach dem Fällen der transkribierten RNA wurde diese in 100 µl Hybridisierungspuffer (siehe 4.2.1) aufgenommen.

Für die Hybridisierung an membrangebundene Nukleinsäuren wurden im Regelfall *antisense*-Sonden mit 3000 Ci/mol [α -³²P]-dCTP von Amersham, Braunschweig, markiert. Dafür wurde das *Strip-EZ RNA*-Kit von Ambion, Huntingdon, UK, eingesetzt. Die Präparation der DNA-Vorlage erfolgte analog zur Herstellung von *in situ*-Sonden.

4.4.4 Hybridisierung an membrangebundene Nukleinsäuren

Die Herstellung von Northern-Blots (vorherige Auftrennung von Gesamt-RNA entsprechend ihrer Lauflänge auf denaturierenden Agarose-Gelen) und Slot-Blots (punktuelles Aufbringen der Gesamt-RNA auf einem schmalen Streifen) erfolgte gemäß bekannter Methoden (Sambrock et al., 1989). Für die Aufbringung der RNA auf Slot-Blots wurde eine Apparatur Minifold II von Schleicher & Schuell, Dassel, benutzt. In beiden Fällen wurden die Nukleinsäuren mit der positiv-geladenen Nylonmembran mittels eines UV Stratalinker 2400 von Stratagene in der automatischen Einstellung quervernetzt.

Die Hybridisierung erfolgte in Puffern des *Northern Max*-Kitsystems von Ambion gemäß Herstellerangaben. Nicht-radioaktive Hybridisierungen wurden mit dem DIG-RNA-Detektion-Kit von Boehringer/Roche detektiert, radioaktive Hybridisierungen per Autoradiographie auf Biomax MS-Film von Kodak, Stuttgart.

4.4.5 Letalitätstest nach bakterieller Expression putativ antimikrobieller Peptide

Putativ antimikrobielle Peptide wurden *in vivo* durch Expression in Bakterien auf ihre Zytotoxizität überprüft. Dazu wurden Expressionskonstrukte pRSETa mit der cDNA für das entsprechende Peptid in *E. coli* BL21(DE3), verfügbar von Novagen/Merck Biosciences, Darmstadt, transformiert und zunächst auf reguläre Ampicillin-haltige Kulturplatten ausplattiert. Je drei zu gut sichtbarer Größe herangewachsene Kolonien wurden gepickt, in jeweils 1 ml LB-Medium resuspendiert, und auf Ampicillin-haltige Kulturplatten mit 1 mM Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid zur Induktion der bakteriellen Expression ausgewählt. Zusätzlich wurden als Referenz in einem vierten Quadranten Bakterien vom Typ *E. coli* BL21(DE3) ausgestrichen, die leeren Vektor pRSETa enthielten. Nach 12-18 h wurde dann die Zellzahl der Testproben im Vergleich zur Referenz bestimmt.

4.5 Zellkulturtechnik

Für die Betrachtung isolierter Zellen wurde die Zellkulturlinie SL2 („Schneider-Zellen“; Schneider, 1972) geführt, die aus späten Embryonalstadien angelegt wurde und nicht näher charakterisiert ist. Die Zellen wurden in Schneider-Medium für die Zellkultur in 75 cm²-Kulturflaschen von BD Biosciences, Heidelberg, unter Beigabe von 10% fötalem Kälberserum und 100 μ g/ml Penicillin-Streptomycin-Lösung kultiviert, wofür alle Komponenten von Gibco BRL, Eggenstein, bezogen wurden. Die Zellen wurden alle 2-5 Tage passagiert, wobei vollständige Konfluenz möglichst vermieden wurde.

4.5.1 Transfektion

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und etwa eine Stunde vor Transfektion in frischem Medium auf 60 mm-Platten mit je 10⁶ Zellen verteilt. Für die Transfektion der Zellen mit DNA wurde das *Effectene Transfection*-Kit von Qiagen oder das Reagenz Dimethyldioctadecylammonium-Bromid (DDAB) von Fluka/Sigma-Aldrich benutzt und nach Anweisungen der Hersteller oder publiziertem Protokoll (Han, 1996) verfahren. Die Effizienz der Transfektion wurde durch den Einsatz geeigneter Reporter (Renilla-Luciferase in pRL-SV40, Promega, oder β -Galaktosidase in pAct, Dr. Mitsuko Tamori, unveröffentlicht) überprüft.

4.6 Nachweismethoden für das Stickstoffmonoxid-Radikal

Bei Stickstoffmonoxid handelt es sich um ein Radikal, das durch seine im biologischen Sinne kurze Lebensdauer von <5 s gekennzeichnet ist. Seine Reaktionsprodukte können als Nitrosylliganden-

Metallkomplex oder als Nitrit und Nitrat nachgewiesen werden. Dies erfordert, dass der direkte NO-Nachweis *in vivo* geführt wird, da NO von jeglichem Fixiervorgang nicht erfasst wird.

4.6.1 Visualisierung mittels 4,5-Diamonifluorescein

Der Farbstoff 4,5-Diamonifluorescein (DAF) von Sigma-Aldrich ist zellpermeabel und reagiert im zellulären Milieu (also bei etwa neutralen pH-Wert) mit dem NO-Radikal zu einem fluoreszenten Produkt (Kojima et al., 1998). Dieses kann über die Anregung bei 492 nm und Emission bei 515 nm sichtbar gemacht werden, wobei wegen des zum grün-fluoreszierenden Protein ähnlichen Fluoreszenzverhaltens laborübliche Filter für die Mikroskopie eingesetzt werden können. DAF wurde in empirisch bestimmten Mengen von 50 µM bis 1 mM für Färbversuche in Embryonen als auch für die Beigabe zu Zellkultur eingesetzt. Während der Applikation von DAF wurde in abgedunkelter Umgebung gearbeitet.

4.6.2 NADPH-Diaphorasefärbung

Die NADPH-Diaphoraseuntereinheit der Stickstoffmonoxid-Synthase bleibt auch nach Präparation von Embryonen, beispielsweise in PBS-präpariertem (Ott und Burrows, 1999) oder mit Paraformaldehyd fixiertem Gewebe (Wildemann und Bicker, 1999; Freitas et al., 2002) über längere Zeit funktionell erhalten. Führt man ihr das natürliche Substrat NADPH zu, beobachtet man eine chemische Reaktion mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT), was zur Dunkelfärbung von NO-Synthase-aktiven Zellen führt. Die Diaphorasefärbung wurde mit fixierten Embryonen unter Beigabe von 1 mM NADPH und 0,2 mM NBT durchgeführt. Gestoppt wurde die Färbung durch mehrfachen Austausch gegen PBS.

4.6.3 Nitrit/Nitrat-Nachweis mit Griess'schem Reagenz

Das NO-Radikal reagiert in wässriger Lösung leicht zu Nitrit und Nitrat. Dieses kann mit Griess'schem Reagenz (Griess, 1879) von Sigma-Aldrich im Bereich von 0,5-65 µmol nachgewiesen werden. Hierzu wurden etwa 100-500 Embryonen in 100 µl PBS in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zerstoßen und das Homogenisat anschließend 5 min in der Tischzentrifuge auf voller Leistung zentrifugiert. Davon wurden 10 µl in 90 µl Griess'sches Reagenz gelöst, gemischt, und nach 15 min photometrisch die Absorption bei 540 nm im Vergleich zur Leerprobe bestimmt.

4.6.4 Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie)

Die ESR-Spektroskopie dient zum Nachweis von ungepaarten Elektronen in Molekülen, also auch von Radikalen. Dabei macht man sich den Zeeman-Effekt zu Nutze, der die Interaktion des magnetischen Moments ungepaarter Elektronen mit einem äußeren Magnetfeld beschreibt (Atkins und de Paula, 2001). Legt man ein Magnetfeld bestimmter Feldstärke an, so kann das Elektronensystem im Resonanzfall von Strahlung im Bereich der Mikrowelle liegenden Frequenz angeregt werden, es kommt zur Absorption. Genau genommen handelt es sich bei der ESR-Spektroskopie also um eine

Absorptionsspektroskopie, nur dass nicht der Betrag der Absorption interessiert, sondern die notwendige Feldstärkenmodulation für das Absorptionsereignis, die den Landé-Faktor g beeinflusst. Mittels Tabellenwerken und Referenzmessungen kann man zwischen der ermittelten Magnetfeldstärke und dem zugrunde liegenden Radikal korrelieren.

Für die vorliegende Arbeit wurde ein ESR-Komplettsystem EMX der Firma Bruker Biospin, Rheinstetten, des Instituts für Anorganische Chemie der Universität Göttingen eingesetzt. Die Bedienung des Spektroskops und grundsätzliche Dateninterpretation erfolgte durch Frau Dr. A. Claudia Stückl. Alle Messungen wurden bei -150 °C durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte unmittelbar vor Messung der Proben. Dafür wurden herstellerempfohlene Röhrchen aus Quarzglas mit 3 mm Innendurchmesser mit 500-2000 dechorionisierten und vorsichtig getrockneten Embryonen gefüllt. Diese wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Justierung im Gerät dort gelagert.

5 Literaturverzeichnis

- Abraham, J. A.**, Mergia, A., Whang, J. L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K. A., Gospodarowicz, D., und Fiddes, J. C. (1986). Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233, 545-548.
- Adams, M. D.**, Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Adryan, B.** (2000) Cloning and Characterization of *d-vhl*, the Homologue to Human *vhl* in the Fruit-Fly *Drosophila melanogaster*, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz und Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA.
- Adryan, B.**, Decker, H. J., Papas, T. S., und Hsu, T. (2000). Tracheal development and the von Hippel-Lindau tumor suppressor homolog in *Drosophila*. *Oncogene* 19, 2803-2811.
- Adryan, B.**, und Schuh, R. (2004). Gene ontology-based clustering of gene expression data. *Bioinformatics*, im Druck
- Affolter, M.**, Montagne, J., Walldorf, U., Groppe, J., Kloter, U., LaRosa, M., und Gehring, W. J. (1994a). The *Drosophila* SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development* 120, 743-753.
- Affolter, M.**, Nellen, D., Nussbaumer, U., und Basler, K. (1994b). Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase THICK VEINS reveal novel functions of TGF beta homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 120, 3105-3117.
- Affolter, M.**, und Shilo, B. Z. (2000). Genetic control of branching morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Curr Opin Cell Biol* 12, 731-735.
- Affymetrix** (2002a). GeneChip® Expression Analysis - Data Analysis Fundamentals.
- Affymetrix** (2002b). GeneChip® Expression Analysis - Technical Manual.
- Agaisse, H.**, und Perrimon, N. (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* 198, 72-82.
- Ahmad, S. M.**, und Baker, B. S. (2002). Sex-specific deployment of FGF signaling in *Drosophila* recruits mesodermal cells into the male genital imaginal disc. *Cell* 109, 651-661.
- Alberts, B.**, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Walter, P. (2002). *Molecular Biology of The Cell*, 4 edn (New York, NY, USA, Garland Science).
- Arbeitman, M. N.**, Furlong, E. E., Imam, F., Johnson, E., Null, B. H., Baker, B. S., Krasnow, M. A., Scott, M. P., Davis, R. W., und White, K. P. (2002). Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* 297, 2270-2275.
- Arena, S.**, Pattarozzi, A., Thellung, S., Villa, V., Corsaro, A., Massa, A., Diana, F., Spoto, G., Forcella, S., Damonte, G., *et al.* (2002). Nitric oxide production stimulated by the basic fibroblast growth factor requires the synthesis of ceramide. *Ann N Y Acad Sci* 973, 94-104.
- Armelin, H. A.** (1973). Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2702-2706.

- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual* (New York, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Ashburner, M.,** Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29.
- Atkins, P.,** und de Paula, J. (2001). *Physical Chemistry*, 7 edn, W.H. Freeman & Company).
- Ausubel, F. M.,** Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., und Struhl, K., eds. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*, 2 edn (New York, NY, USA, John Wiley & Sons).
- Bacon, N. C.,** Wappner, P., O'Rourke, J. F., Bartlett, S. M., Shilo, B., Pugh, C. W., und Ratcliffe, P. J. (1998). Regulation of the *Drosophila* bHLH-PAS protein SIMA by hypoxia: functional evidence for homology with mammalian HIF-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 811-816.
- Barabasi, A. L.,** und Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 5, 101-113.
- Barry, M. K.,** Triplett, A. A., und Christensen, A. C. (1999). A peritrophin-like protein expressed in the embryonic tracheae of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 29, 319-327.
- Baumer, C.,** Pirow, R., und Paul, R. J. (2002). Circulatory oxygen transport in the water flea *Daphnia magna*. *J Comp Physiol [B]* 172, 275-285.
- Beaucher, M. L.,** Hersperger, E., Goodliffe, J., und Shearn, A. (2003). Analysis of the role of extracellular proteases in tumor metastasis. Poster bei: 44th *Annual Drosophila Research Conference* (Chicago, IL, USA).
- Behr, M.,** Riedel, D., und Schuh, R. (2003). The claudin-like *megatrachea* is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in *Drosophila*. *Dev Cell* 5, 611-620.
- Beiman, M.,** Shilo, B. Z., und Volk, T. (1996). HEARTLESS, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev* 10, 2993-3002.
- Beitel, G. J.,** und Krasnow, M. A. (2000). Genetic control of epithelial tube size in the *Drosophila* tracheal system. *Development* 127, 3271-3282.
- Bellusci, S.,** Grindley, J., Emoto, H., Itoh, N., und Hogan, B. L. (1997). Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 124, 4867-4878.
- Beyer, T. A.,** Werner, S., Dickson, C., und Grose, R. (2003). Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. *Exp Cell Res* 287, 228-236.
- Bolouri, H.,** und Davidson, E. H. (2002). Modeling transcriptional regulatory networks. *Bioessays* 24, 1118-1129.
- Bonthius, D. J.,** Karacay, B., Dai, D., und Pantazis, N. J. (2003). FGF-2, NGF and IGF-1, but not BDNF, utilize a nitric oxide pathway to signal neurotrophic and neuroprotective effects against alcohol toxicity in cerebellar granule cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 140, 15-28.
- Borland, C. Z.,** Schutzman, J. L., und Stern, M. J. (2001). Fibroblast growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* 23, 1120-1130.

- Boube, M.,** Llimargas, M., und Casanova, J. (2000). Cross-regulatory interactions among tracheal genes support a co-operative model for the induction of tracheal fates in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* 91, 271-278.
- Boube, M.,** Martin-Bermudo, M. D., Brown, N. H., und Casanova, J. (2001). Specific tracheal migration is mediated by complementary expression of cell surface proteins. *Genes Dev* 15, 1554-1562.
- Boutanaev, A. M.,** Kalmykova, A. I., Shevelyov, Y. Y., und Nurminsky, D. I. (2002). Large clusters of co-expressed genes in the *Drosophila* genome. *Nature* 420, 666-669.
- Boutros, M.,** Agaisse, H., und Perrimon, N. (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 711-722.
- Bradley, P. L.,** und Andrew, D. J. (2001). *ribbon* encodes a novel BTB/POZ protein required for directed cell migration in *Drosophila melanogaster*. *Development* 128, 3001-3015.
- Brand, A. H.,** und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brazma, A.,** Parkinson, H., Sarkans, U., Shojatalab, M., Vilo, J., Abeygunawardena, N., Holloway, E., Kapushesky, M., Kemmeren, P., Lara, G. G., *et al.* (2003). ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic Acids Res* 31, 68-71.
- Breitkreutz, B. J.,** Stark, C., und Tyers, M. (2003). Osprey: a network visualization system. *Genome Biol* 4, R22.
- Brown, S.,** Hu, N., und Hombria, J. C. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol* 11, 1700-1705.
- Bruick, R. K.,** und McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340.
- Bulet, P.,** Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., und Hoffmann, J. A. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem* 268, 14893-14897.
- Burdine, R. D.,** Branda, C. S., und Stern, M. J. (1998). EGL-17(FGF) expression coordinates the attraction of the migrating sex myoblasts with vulval induction in *C. elegans*. *Development* 125, 1083-1093.
- Burge, C.,** und Karlin, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* 268, 78-94.
- Carney, G. E.,** Wade, A. A., Sapra, R., Goldstein, E. S., und Bender, M. (1997). DHR3, an ecdysone-inducible early-late gene encoding a *Drosophila* nuclear receptor, is required for embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12024-12029.
- Carpenter, A. E.,** und Sabatini, D. M. (2004). Systematic genome-wide screens of gene function. *Nat Rev Genet* 5, 11-22.
- Casci, T.,** Vinos, J., und Freeman, M. (1999). SPROUTY, an intracellular inhibitor of RAS signaling. *Cell* 96, 655-665.

- Celniker, S. E.**, Wheeler, D. A., Kronmiller, B., Carlson, J. W., Halpern, A., Patel, S., Adams, M., Champe, M., Dugan, S. P., Frise, E., *et al.* (2002). Finishing a whole-genome shotgun: release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. *Genome Biol* 3, RESEARCH0079.
- Certel, K.**, Anderson, M. G., Shrigley, R. J., and Johnson, W. A. (1996). Distinct variant DNA-binding sites determine cell-specific autoregulated expression of the *Drosophila* POU domain transcription factor *drifter* in midline glia or trachea. *Mol Cell Biol* 16, 1813-1823.
- Chen, C. K.**, Kuhnlein, R. P., Eulenberg, K. G., Vincent, S., Affolter, M., and Schuh, R. (1998). The transcription factors KNIRPS and KNIRPS RELATED control cell migration and branch morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Development* 125, 4959-4968.
- Chen, H. W.**, Chen, X., Oh, S. W., Marinissen, M. J., Gutkind, J. S., and Hou, S. X. (2002a). *mom* identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev* 16, 388-398.
- Chen, Q.**, Ma, E., Behar, K. L., Xu, T., and Haddad, G. G. (2002b). Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 277, 3274-3279.
- Chen, X.**, Oh, S. W., Zheng, Z., Chen, H. W., Shin, H. H., and Hou, S. X. (2003). CYCLIN D-CDK4 and CYCLIN E-CDK2 regulate the Jak/STAT signal transduction pathway in *Drosophila*. *Dev Cell* 4, 179-190.
- Chiang, C.**, Young, K. E., and Beachy, P. A. (1995). Control of *Drosophila* tracheal branching by the novel homeodomain gene *unplugged*, a regulatory target for genes of the bithorax complex. *Development* 121, 3901-3912.
- Chihara, T.**, and Hayashi, S. (2000). Control of tracheal tubulogenesis by WINGLESS signaling. *Development* 127, 4433-4442.
- Colvin, J. S.**, Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B., and Ornitz, D. M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104, 875-889.
- Dammai, V.**, Adryan, B., Lavenburg, K. R., and Hsu, T. (2003). *Drosophila awd*, the homolog of human *nm23*, regulates FGF receptor levels and functions synergistically with *shi/dynammin* during tracheal development. *Genes Dev* 17, 2812-2824.
- de Celis, J. F.**, Llimargas, M., and Casanova, J. (1995). *Ventral veinless*, the gene encoding the CF1A transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. *Development* 121, 3405-3416.
- De Gregorio, E.**, Spellman, P. T., Rubin, G. M., and Lemaitre, B. (2001). Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12590-12595.
- Dennis, G., Jr.**, Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., and Lempicki, R. A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4, P3.
- Deo, D. D.**, Axelrad, T. W., Robert, E. G., Marcheselli, V., Bazan, N. G., and Hunt, J. D. (2002). Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism. *J Biol Chem* 277, 21237-21245.

- Dietrich, B. H.**, Moore, J., Kyba, M., dosSantos, G., McCloskey, F., Milne, T. A., Brock, H. W., and Krause, H. M. (2001). TANTALUS, a novel ASX-interacting protein with tissue-specific functions. *Dev Biol* 234, 441-453.
- DiGregorio, P. J.**, Ubersax, J. A., and O'Farrell, P. H. (2001). Hypoxia and nitric oxide induce a rapid, reversible cell cycle arrest of the *Drosophila* syncytial divisions. *J Biol Chem* 276, 1930-1937.
- Doniger, S. W.**, Salomonis, N., Dahlquist, K. D., Vranizan, K., Lawlor, S. C., and Conklin, B. R. (2003). MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. *Genome Biol* 4, R7.
- Dorfman, R.**, Glazer, L., Weihe, U., Wernet, M. F., and Shilo, B. Z. (2002). ELBOW and NOC define a family of zinc finger proteins controlling morphogenesis of specific tracheal branches. *Development* 129, 3585-3596.
- Dossenbach, C.**, Rock, S., and Affolter, M. (2001). Specificity of FGF signaling in cell migration in *Drosophila*. *Development* 128, 4563-4572.
- Douglas, R. M.**, Xu, T., and Haddad, G. G. (2001). Cell cycle progression and cell division are sensitive to hypoxia in *Drosophila melanogaster* embryos. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, R1555-1563.
- Dunphy, I.**, Vinogradov, S. A., and Wilson, D. F. (2002). Oxyphor R2 and G2: phosphors for measuring oxygen by oxygen-dependent quenching of phosphorescence. *Anal Biochem* 310, 191-198.
- Ebong, S.**, Yu, C. R., Carper, D. A., Chepelinsky, A. B., and Egwuagu, C. E. (2004). Activation of STAT signaling pathways and induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in mammalian lens by growth factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 872-878.
- Edgar, R.**, Domrachev, M., and Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30, 207-210.
- Egger, B.**, Leemans, R., Loop, T., Kammermeier, L., Fan, Y., Radimerski, T., Strahm, M. C., Certa, U., and Reichert, H. (2002). Gliogenesis in *Drosophila*: genome-wide analysis of downstream genes of *glial cells missing* in the embryonic nervous system. *Development* 129, 3295-3309.
- Eisen, M. B.**, Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.
- Englund, C.**, Steneberg, P., Falileeva, L., Xylourgidis, N., and Samakovlis, C. (2002). Attractive and repulsive functions of SLIT are mediated by different receptors in the *Drosophila* trachea. *Development* 129, 4941-4951.
- Englund, C.**, Uv, A. E., Cantera, R., Mathies, L. D., Krasnow, M. A., and Samakovlis, C. (1999). *adrift*, a novel *bnl*-induced *Drosophila* gene, required for tracheal pathfinding into the CNS. *Development* 126, 1505-1514.
- Eriksson, A. E.**, Cousens, L. S., Weaver, L. H., and Matthews, B. W. (1991). Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3441-3445.
- Esch, F.**, Baird, A., Ling, N., Ueno, N., Hill, F., Denoroy, L., Klepper, R., Gospodarowicz, D., Bohlen, P., and Guillemin, R. (1985). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6507-6511.

- Eulenberg, K. G.,** und Schuh, R. (1997). The *tracheae defective* gene encodes a bZIP protein that controls tracheal cell movement during *Drosophila* embryogenesis. *Embo J* 16, 7156-7165.
- Fields, S.,** und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- FlyBase Consortium** (2003). The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res* 31, 172-175.
- Foley, E.,** und O'Farrell, P. H. (2003). Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev* 17, 115-125.
- Frazier, M. R.,** Woods, H. A., und Harrison, J. F. (2001). Interactive effects of rearing temperature and oxygen on the development of *Drosophila melanogaster*. *Physiol Biochem Zool* 74, 641-650.
- Freitas, I.,** Griffini, P., Bertone, V., Bertone, R., Fenoglio, C., Milliere, R., und Vairetti, M. (2002). *In situ* detection of reactive oxygen species and nitric oxide production in normal and pathological tissues: improvement by differential interference contrast. *Exp Gerontol* 37, 591-602.
- Friedman, N.** (2004). Inferring cellular networks using probabilistic graphical models. *Science* 303, 799-805.
- Fujita, S. C.,** Zipursky, S. L., Benzer, S., Ferrus, A., und Shotwell, S. L. (1982). Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7929-7933.
- Gabay, L.,** Seger, R., und Shilo, B. Z. (1997). In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science* 277, 1103-1106.
- Galkow, M. J.,** und Krasnow, M. (2001). Wound healing in *Drosophila melanogaster*. Poster bei: 42nd Annual *Drosophila Research Conference* (Washington, D.C., USA).
- Gambarini, A. G.,** und Armelin, H. A. (1982). Purification and partial characterization of an acidic fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* 257, 9692-9697.
- Ge, H.,** Walhout, A. J., und Vidal, M. (2003). Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet* 19, 551-560.
- Gecz, J.,** Baker, E., Donnelly, A., Ming, J. E., McDonald-McGinn, D. M., Spinner, N. B., Zackai, E. H., Sutherland, G. R., und Mulley, J. C. (1999). Fibroblast growth factor homologous factor 2 (FHF2): gene structure, expression and mapping to the Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome region in Xq26 delineated by a duplication breakpoint in a BFLS-like patient. *Hum Genet* 104, 56-63.
- GeneOntology Consortium** (2001). Creating the gene ontology resource: design and implementation. *Genome Res* 11, 1425-1433.
- Ghabrial, A.,** Luschnig, S., Metzstein, M. M., und Krasnow, M. A. (2003). Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 623-647.
- Gibbons, F. D.,** und Roth, F. P. (2002). Judging the quality of gene expression-based clustering methods using gene annotation. *Genome Res* 12, 1574-1581.
- Giot, L.,** Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., *et al.* (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302, 1727-1736.

- Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q., und Michelson, A. M. (1996).** *heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 10, 3003-3017.
- Glazer, L., und Shilo, B. Z. (1991).** The *Drosophila* FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev* 5, 697-705.
- Glazer, L., und Shilo, B. Z. (2001).** HEDGEHOG signaling patterns the tracheal branches. *Development* 128, 1599-1606.
- Goldfarb, M. (2001).** Signaling by fibroblast growth factors: the inside story. *Sci STKE* 2001, PE37.
- Gospodarowicz, D. (1974).** Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249, 123-127.
- Grunderath, S., Stollewerk, A., Greig, S., Goodman, C. S., O'Kane, C. J., und Klambt, C. (1999).** *loco* encodes an RGS protein required for *Drosophila* glial differentiation. *Development* 126, 1781-1791.
- Greenspan, R. (1997).** Fly Pushing (New York, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Griess, P. (1879).** Über einige Azoverbindungen. *Chem Ber* 12, 426.
- Gryzik, T., und Muller, H. A. (2004).** FGF8-like1 and FGF8-like2 encode putative ligands of the FGF receptor HTL and are required for mesoderm migration in the *Drosophila* gastrula. *Curr Biol* 14, 659-667.
- Guillemin, K., Groppe, J., Ducker, K., Treisman, R., Hafen, E., Affolter, M., und Krasnow, M. A. (1996).** The *pruned* gene encodes the *Drosophila* serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system. *Development* 122, 1353-1362.
- Guillemin, K., Williams, T., und Krasnow, M. (1997).** Genetic control of terminal branch outgrowth and guidance in the *Drosophila* tracheal system. Poster bei: 38th Annual *Drosophila Research Conference* (Chicago, IL, USA).
- Hacker, U., Kaufmann, E., Hartmann, C., Jurgens, G., Knochel, W., und Jackle, H. (1995).** The *Drosophila* fork head domain protein CROCODILE is required for the establishment of head structures. *Embo J* 14, 5306-5317.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., und Krasnow, M. A. (1998).** *sprouty* encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92, 253-263.
- Haddad, G. G., Sun, Y., Wyman, R. J., und Xu, T. (1997).** Genetic basis of tolerance to O₂ deprivation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10809-10812.
- Hampton, T. G., Amende, I., Fong, J., Laubach, V. E., Li, J., Metais, C., und Simons, M. (2000).** Basic FGF reduces stunning via a NOS2-dependent pathway in coronary-perfused mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H260-268.
- Han, K. (1996).** An efficient DDAB-mediated transfection of *Drosophila* S2 cells. *Nucleic Acids Res* 24, 4362-4363.

- Harrison, D. A.,** McCoon, P. E., Binari, R., Gilman, M., und Perrimon, N. (1998). *Drosophila unpaired* encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev* 12, 3252-3263.
- Hartenstein, V.** (1993). *Atlas of Drosophila Development* (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hogan, B. L.** (1999). Morphogenesis. *Cell* 96, 225-233.
- Hynes, R. O.,** und Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol* 150, F89-96.
- Ikeya, T.,** und Hayashi, S. (1999). Interplay of NOTCH and FGF signaling restricts cell fate and MAPK activation in the *Drosophila* trachea. *Development* 126, 4455-4463.
- Imam, F.,** Sutherland, D., Huang, W., und Krasnow, M. A. (1999). *stumps*, a *Drosophila* gene required for fibroblast growth factor (FGF)-directed migrations of tracheal and mesodermal cells. *Genetics* 152, 307-318.
- Irving, P.,** Troxler, L., Heuer, T. S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., und Hetru, C. (2001). A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15119-15124.
- Isaac, D. D.,** und Andrew, D. J. (1996). Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the *trachealess* gene product. *Genes Dev* 10, 103-117.
- Jarecki, J.,** Johnson, E., und Krasnow, M. A. (1999). Oxygen regulation of airway branching in *Drosophila* is mediated by branchless FGF. *Cell* 99, 211-220.
- Jiang, J.,** Kosman, D., Ip, Y. T., und Levine, M. (1991). The DORSAL morphogen gradient regulates the mesoderm determinant *twist* in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 5, 1881-1891.
- Jin, J.,** Anthopoulos, N., Wetsch, B., Binari, R. C., Isaac, D. D., Andrew, D. J., Woodgett, J. R., und Manoukian, A. S. (2001). Regulation of *Drosophila* tracheal system development by protein kinase B. *Dev Cell* 1, 817-827.
- Kamimura, K.,** Fujise, M., Villa, F., Izumi, S., Habuchi, H., Kimata, K., und Nakato, H. (2001). *Drosophila* heparan sulfate 6-O-sulfotransferase (dHS6ST) gene. Structure, expression, and function in the formation of the tracheal system. *J Biol Chem* 276, 17014-17021.
- Kanehisa, M.,** und Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27-30.
- Klamt, C.,** Glazer, L., und Shilo, B. Z. (1992). *breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells. *Genes Dev* 6, 1668-1678.
- Kloek, G. P.** (1979). Oxygen levels safe for continued reproduction of *Drosophila* in normal and hypobaric atmospheres. *Aviat Space Environ Med* 50, 1126-1128.
- Kojima, H.,** Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., und Nagano, T. (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70, 2446-2453.
- Kramer, S.,** Okabe, M., Hacohen, N., Krasnow, M. A., und Hiromi, Y. (1999). SPROUTY: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development* 126, 2515-2525.

- Kuhnlein, R. P.**, und Schuh, R. (1996). Dual function of the region-specific homeotic gene *spalt* during *Drosophila* tracheal system development. *Development* 122, 2215-2223.
- Landis, G. N.**, Abdueva, D., Skvortsov, D., Yang, J., Rabin, B. E., Carrick, J., Tavare, S., und Tower, J. (2004). Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7663-7668.
- Lavenburg, K. R.**, Ivey, J., Hsu, T., und Muise-Helmericks, R. C. (2003). Coordinated functions of Akt/PKB and ETS1 in tubule formation. *Faseb J* 17, 2278-2280.
- Lavista-Llanos, S.**, Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D. M., Gleadle, J. M., Bocca, S. N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P. J., und Wappner, P. (2002). Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein SIMILAR. *Mol Cell Biol* 22, 6842-6853.
- Lee, P. L.**, Johnson, D. E., Cousens, L. S., Fried, V. A., und Williams, L. T. (1989). Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 245, 57-60.
- Lee, T.**, Hacohen, N., Krasnow, M., und Montell, D. J. (1996). Regulated BREATHLESS receptor tyrosine kinase activity required to pattern cell migration and branching in the *Drosophila* tracheal system. *Genes Dev* 10, 2912-2921.
- Leemans, R.**, Egger, B., Loop, T., Kammermeier, L., He, H., Hartmann, B., Certa, U., Hirth, F., und Reichert, H. (2000). Quantitative transcript imaging in normal and heat-shocked *Drosophila* embryos by using high-density oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12138-12143.
- Leptin, M.** (1991). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* 5, 1568-1576.
- Levashina, E. A.**, Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J. M., Hetru, C., und Hoffmann, J. A. (1995). METCHNIKOWIN, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur J Biochem* 233, 694-700.
- Lewis, S. E.**, Searle, S. M., Harris, N., Gibson, M., Lyer, V., Richter, J., Wiel, C., Bayraktaroglu, L., Birney, E., Crosby, M. A., *et al.* (2002). Apollo: a sequence annotation editor. *Genome Biol* 3, RESEARCH0082.
- Lin, X.**, Buff, E. M., Perrimon, N., und Michelson, A. M. (1999). Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* 126, 3715-3723.
- Litingtung, Y.**, Lei, L., Westphal, H., und Chiang, C. (1998). Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 20, 58-61.
- Liu, C.**, Gaspar, J. A., Wong, H. J., und Meiering, E. M. (2002). Conserved and nonconserved features of the folding pathway of HISACTOPHILIN, a beta-trefoil protein. *Protein Sci* 11, 669-679.
- Liu, L.**, Johnson, W. A., und Welsh, M. J. (2003). *Drosophila* DEG/ENaC pickpocket genes are expressed in the tracheal system, where they may be involved in liquid clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2128-2133.
- Llimargas, M.** (2000). WINGLESS and its signalling pathway have common and separable functions during tracheal development. *Development* 127, 4407-4417.

- Llimargas, M.**, und Casanova, J. (1997). VENTRAL VEINLESS, a POU domain transcription factor, regulates different transduction pathways required for tracheal branching in *Drosophila*. *Development* 124, 3273-3281.
- Llimargas, M.**, und Casanova, J. (1999). EGF signalling regulates cell invagination as well as cell migration during formation of tracheal system in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 209, 174-179.
- Llimargas, M.**, und Lawrence, P. A. (2001). Seven WNT homologues in *Drosophila*: a case study of the developing tracheae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14487-14492.
- Locke, M.** (1958). The co-ordination of growth in the tracheal system of insects. *Q J Microsc Sci* 99, 373-391.
- Ma, E.**, Gu, X. Q., Wu, X., Xu, T., und Haddad, G. G. (2001). Mutation in pre-mRNA adenosine deaminase markedly attenuates neuronal tolerance to O₂ deprivation in *Drosophila melanogaster*. *J Clin Invest* 107, 685-693.
- Macdonald, P. M.**, und Struhl, G. (1986). A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern. *Nature* 324, 537-545.
- Manning, G.**, und Krasnow, M. A. (1993). Development of the *Drosophila* tracheal system. In *The Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate, und A. Martinez Arias, eds. (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 609-685.
- Mariani, T. J.**, Budhraj, V., Mecham, B. H., Gu, C. C., Watson, M. A., und Sadovsky, Y. (2003). A variable fold change threshold determines significance for expression microarrays. *Faseb J* 17, 321-323.
- Metzger, R. J.**, und Krasnow, M. A. (1999). Genetic control of branching morphogenesis. *Science* 284, 1635-1639.
- Michelson, A. M.**, Gisselbrecht, S., Buff, E., und Skeath, J. B. (1998). HEARTBROKEN is a specific downstream mediator of FGF receptor signalling in *Drosophila*. *Development* 125, 4379-4389.
- Min, H.**, Danilenko, D. M., Scully, S. A., Bolon, B., Ring, B. D., Tarpley, J. E., DeRose, M., und Simonet, W. S. (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila branchless*. *Genes Dev* 12, 3156-3161.
- Misra, S.**, Crosby, M. A., Mungall, C. J., Matthews, B. B., Campbell, K. S., Hradecky, P., Huang, Y., Kaminker, J. S., Millburn, G. H., Prochnik, S. E., *et al.* (2002). Annotation of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome: a systematic review. *Genome Biol* 3, RESEARCH0083.
- Montagne, J.**, Groppe, J., Guillemain, K., Krasnow, M. A., Gehring, W. J., und Affolter, M. (1996). The *Drosophila* SERUM RESPONSE FACTOR gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered. *Development* 122, 2589-2597.
- Montalta-He, H.**, Leemans, R., Loop, T., Strahm, M., Certa, U., Primig, M., Acampora, D., Simeone, A., und Reichert, H. (2002). Evolutionary conservation of OTD/OTX2 transcription factor action: a genome-wide microarray analysis in *Drosophila*. *Genome Biol* 3, RESEARCH0015.
- Mungall, C. J.**, Misra, S., Berman, B. P., Carlson, J., Frise, E., Harris, N., Marshall, B., Shu, S., Kaminker, J. S., Prochnik, S. E., *et al.* (2002). An integrated computational pipeline and database to support whole-genome sequence annotation. *Genome Biol* 3, RESEARCH0081.

- Murphy, P. R.**, Limoges, M., Dodd, F., Boudreau, R. T., and Too, C. K. (2001). Fibroblast growth factor-2 stimulates endothelial nitric oxide synthase expression and inhibits apoptosis by a nitric oxide-dependent pathway in Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 142, 81-88.
- Naef, F.**, Hacker, C. R., Patil, N., and Magnasco, M. (2002). Empirical characterization of the expression ratio noise structure in high-density oligonucleotide arrays. *Genome Biol* 3, RESEARCH0018.
- Nagao, M.**, Ebert, B. L., Ratcliffe, P. J., and Pugh, C. W. (1996). *Drosophila melanogaster* SL2 cells contain a hypoxically inducible DNA binding complex which recognises mammalian HIF-binding sites. *FEBS Lett* 387, 161-166.
- Nambu, J. R.**, Chen, W., Hu, S., and Crews, S. T. (1996). The *Drosophila melanogaster* similar bHLH-PAS gene encodes a protein related to human hypoxia-inducible factor 1 alpha and *Drosophila single-minded*. *Gene* 172, 249-254.
- Ohshiro, T.**, Emori, Y., and Saigo, K. (2002). Ligand-dependent activation of *breathless* FGF receptor gene in *Drosophila* developing trachea. *Mech Dev* 114, 3-11.
- Ohshiro, T.**, and Saigo, K. (1997). Transcriptional regulation of *breathless* FGF receptor gene by binding of TRACHEALESS/dARNT heterodimers to three central midline elements in *Drosophila* developing trachea. *Development* 124, 3975-3986.
- Ornitz, D. M.** (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22, 108-112.
- Ornitz, D. M.**, and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2, REVIEWS3005.
- Ortega, S.**, Ittmann, M., Tsang, S. H., Ehrlich, M., and Basilico, C. (1998). Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5672-5677.
- Osborne, K. A.**, Robichon, A., Burgess, E., Butland, S., Shaw, R. A., Coulthard, A., Pereira, H. S., Greenspan, R. J., and Sokolowski, M. B. (1997). Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*. *Science* 277, 834-836.
- Ott, S. R.**, and Burrows, M. (1999). NADPH diaphorase histochemistry in the thoracic ganglia of locusts, crickets, and cockroaches: species differences and the impact of fixation. *J Comp Neurol* 410, 387-397.
- Ottmann, T.**, and Widmayer, P. (2002). Algorithmen und Datenstrukturen, 4 edn (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- Patel, N. H.**, Snow, P. M., and Goodman, C. S. (1987). Characterization and cloning of *fasciclin III*: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48, 975-988.
- Perkins, L. A.**, Johnson, M. R., Melnick, M. B., and Perrimon, N. (1996). The nonreceptor protein tyrosine phosphatase CORKSCREW functions in multiple receptor tyrosine kinase pathways in *Drosophila*. *Dev Biol* 180, 63-81.
- Perrimon, N.**, Noll, E., McCall, K., and Brand, A. (1991). Generating lineage-specific markers to study *Drosophila* development. *Dev Genet* 12, 238-252.
- Peters, K.**, Werner, S., Liao, X., Wert, S., Whitsett, J., and Williams, L. (1994). Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *Embo J* 13, 3296-3301.

- Peters, K. G.**, Werner, S., Chen, G., und Williams, L. T. (1992). Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development* 114, 233-243.
- Petit, V.**, Nussbaumer, U., Dossenbach, C., und Affolter, M. (2004). Downstream-of-FGFR is a fibroblast growth factor-specific scaffolding protein and recruits CORKSCREW upon receptor activation. *Mol Cell Biol* 24, 3769-3781.
- Pirow, R.**, Baumer, C., und Paul, R. J. (2004). Two-dimensional oxygen gradients in the circulatory system of the microcrustacean *Daphnia magna*. Manuskript in Vorbereitung.
- Pirow, R.**, Wollinger, F., und Paul, R. J. (1999). The sites of respiratory gas exchange in the planktonic crustacean *Daphnia magna*: an *in vivo* study employing blood haemoglobin as an internal oxygen probe. *J Exp Biol* 202 Pt 22, 3089-3099.
- Pletcher, S. D.**, Macdonald, S. J., Marguerie, R., Certa, U., Stearns, S. C., Goldstein, D. B., und Partridge, L. (2002). Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 12, 712-723.
- Plotnikov, A. N.**, Hubbard, S. R., Schlessinger, J., und Mohammadi, M. (2000). Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell* 101, 413-424.
- Quackenbush, J.** (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 32 Suppl, 496-501.
- Reese, M. G.**, Hartzell, G., Harris, N. L., Ohler, U., Abril, J. F., und Lewis, S. E. (2000). Genome annotation assessment in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 10, 483-501.
- Reich, A.**, Sapir, A., und Shilo, B. (1999). SPROUTY is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* 126, 4139-4147.
- Reichman-Fried, M.**, Dickson, B., Hafen, E., und Shilo, B. Z. (1994). Elucidation of the role of *breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, in tracheal cell migration. *Genes Dev* 8, 428-439.
- Reichman-Fried, M.**, und Shilo, B. Z. (1995). BREATHLESS, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is required for the onset of tracheal cell migration and tracheole formation. *Mech Dev* 52, 265-273.
- Ribeiro, C.**, Ebner, A., und Affolter, M. (2002). *In vivo* imaging reveals different cellular functions for FGF and DPP signaling in tracheal branching morphogenesis. *Dev Cell* 2, 677-683.
- Roberts, D. B.**, ed. (1998). *Drosophila: A Practical Approach*, 2 edn (Oxford, Oxford University Press).
- Rosengard, A. M.**, Krutzsch, H. C., Shearn, A., Biggs, J. R., Barker, E., Margulies, I. M., King, C. R., Liotta, L. A., und Steeg, P. S. (1989). Reduced NM23/AWD protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 342, 177-180.
- Ruberte, E.**, Marty, T., Nellen, D., Affolter, M., und Basler, K. (1995). An absolute requirement for both the type II and type I receptors, PUNT and THICK VEINS, for DPP signaling *in vivo*. *Cell* 80, 889-897.
- Samakovlis, C.**, Hacohen, N., Manning, G., Sutherland, D. C., Guillemin, K., und Krasnow, M. A. (1996a). Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development* 122, 1395-1407.

- Samakovlis, C.**, Manning, G., Steneberg, P., Hacohen, N., Cantera, R., und Krasnow, M. A. (1996b). Genetic control of epithelial tube fusion during *Drosophila* tracheal development. *Development* 122, 3531-3536.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E. J., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Vol 1-3, 2 edn (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press).
- Sato, M.**, und Kornberg, T. B. (2002). FGF is an essential mitogen and chemoattractant for the air sacs of the drosophila tracheal system. *Dev Cell* 3, 195-207.
- Schena, M.**, Shalon, D., Davis, R. W., und Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Schneider, I.** (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 27, 353-365.
- Sekine, K.**, Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., und Kato, S. (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* 21, 138-141.
- Shiga, Y.**, Tanaka-Matakatsu, M., und Hayashi, S. (1996). A nuclear GFP/ β -Galactosidase fusion protein as a marker for morphogenesis in living *Drosophila*. *Dev, Growth Diffn* 38, 99-106.
- Shim, K.**, Blake, K. J., Jack, J., und Krasnow, M. A. (2001). The *Drosophila* *ribbon* gene encodes a nuclear BTB domain protein that promotes epithelial migration and morphogenesis. *Development* 128, 4923-4933.
- Shishido, E.**, Higashijima, S., Emori, Y., und Saigo, K. (1993). Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* 117, 751-761.
- Shishido, E.**, Ono, N., Kojima, T., und Saigo, K. (1997). Requirements of DFR1/HEARTLESS, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* 124, 2119-2128.
- Simon, J. A.**, und Tamkun, J. W. (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of *polycomb* and *trithorax* group complexes. *Curr Opin Genet Dev* 12, 210-218.
- Sonnenfeld, M.**, Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S., und Crews, S. (1997). The *Drosophila* *tango* gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development* 124, 4571-4582.
- Spellman, P. T.**, und Rubin, G. M. (2002). Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. *J Biol I*, 5.
- Spradling, A. C.**, Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S., und Rubin, G. M. (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* 153, 135-177.
- Spradling, A. C.**, Stern, D. M., Kiss, I., Roote, J., Lavery, T., und Rubin, G. M. (1995). Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10824-10830.

- Stapleton, M.**, Liao, G., Brokstein, P., Hong, L., Carninci, P., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Champe, M., Pacleb, J., Wan, K., *et al.* (2002). The *Drosophila* gene collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome Res* 12, 1294-1300.
- Stathopoulos, A.**, Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M., und Levine, M. (2004). *pyramus* and *thisbe*: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 18, 687-699.
- Stathopoulos, A.**, Van Drenth, M., Erives, A., Markstein, M., und Levine, M. (2002). Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Cell* 111, 687-701.
- Steneberg, P.**, Englund, C., Kronhamn, J., Weaver, T. A., und Samakovlis, C. (1998). Translational readthrough in the *hdc* mRNA generates a novel branching inhibitor in the *Drosophila* trachea. *Genes Dev* 12, 956-967.
- Strecker, T. R.**, McGhee, S., Shih, S., und Ham, D. (1994). Permeabilization, staining and culture of living *Drosophila* embryos. *Biotech Histochem* 69, 25-30.
- Sturn, A.**, Quackenbush, J., und Trajanoski, Z. (2002). Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18, 207-208.
- Sutherland, D.**, Samakovlis, C., und Krasnow, M. A. (1996). *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87, 1091-1101.
- Takaesu, N. T.**, Johnson, A. N., Sultani, O. H., und Newfeld, S. J. (2002). Combinatorial signaling by an unconventional WG pathway and the DPP pathway requires NEJIRE (CBP/p300) to regulate *dpp* expression in posterior tracheal branches. *Dev Biol* 247, 225-236.
- Tanaka-Matakatsu, M.**, Uemura, T., Oda, H., Takeichi, M., und Hayashi, S. (1996). Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor ESCARGOT. *Development* 122, 3697-3705.
- Tautz, D.**, und Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98, 81-85.
- Tefft, D.**, Lee, M., Smith, S., Crowe, D. L., Bellusci, S., und Warburton, D. (2002). MSPROUTY2 inhibits FGF10-activated MAP kinase by differentially binding to upstream target proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L700-706.
- Tomancak, P.**, Beaton, A., Weiszmam, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Hartenstein, V., Celniker, S. E., und Rubin, G. M. (2002). Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol* 3, RESEARCH0088.
- Tusher, V. G.**, Tibshirani, R., und Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-5121.
- Ueda, H. R.**, Matsumoto, A., Kawamura, M., Iino, M., Tanimura, T., und Hashimoto, S. (2002). Genome-wide transcriptional orchestration of circadian rhythms in *Drosophila*. *J Biol Chem* 277, 14048-14052.
- Uttenweiler-Joseph, S.**, Moniatte, M., Lagueux, M., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J. A., und Bulet, P. (1998). Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11342-11347.

- Uv, A., Cantera, R., und Samakovlis, C. (2003). *Drosophila* tracheal morphogenesis: intricate cellular solutions to basic plumbing problems. *Trends Cell Biol* 13, 301-309.
- Vincent, S., Ruberte, E., Grieder, N. C., Chen, C. K., Haerry, T., Schuh, R., und Affolter, M. (1997). DPP controls tracheal cell migration along the dorsoventral body axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 124, 2741-2750.
- Vincent, S., Wilson, R., Coelho, C., Affolter, M., und Leptin, M. (1998). The *Drosophila* protein DOF is specifically required for FGF signaling. *Mol Cell* 2, 515-525.
- Wappner, P., Gabay, L., und Shilo, B. Z. (1997). Interactions between the EGF receptor and DPP pathways establish distinct cell fates in the tracheal placodes. *Development* 124, 4707-4716.
- Warburton, D., Schwarz, M., Tefft, D., Flores-Delgado, G., Anderson, K. D., und Cardoso, W. V. (2000). The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev* 92, 55-81.
- Wigglesworth, V. B. (1954). Growth and regeneration in the tracheal system of an insect, *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol* 36, 632-640.
- Wildemann, B., und Bicker, G. (1999). Developmental expression of nitric oxide/cyclic GMP synthesizing cells in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* 38, 1-15.
- Wilk, R., Weizman, I., und Shilo, B. Z. (1996). *trachealless* encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev* 10, 93-102.
- Willert, K., Shibamoto, S., und Nusse, R. (1999). WNT-induced dephosphorylation of AXIN releases beta-catenin from the AXIN complex. *Genes Dev* 13, 1768-1773.
- Wingrove, J. A., und O'Farrell, P. H. (1999). Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. *Cell* 98, 105-114.
- Wolf, C., Gerlach, N., und Schuh, R. (2002). *Drosophila* tracheal system formation involves FGF-dependent cell extensions contacting bridge-cells. *EMBO Rep* 3, 563-568.
- Wolf, C., und Schuh, R. (2000). Single mesodermal cells guide outgrowth of ectodermal tubular structures in *Drosophila*. *Genes Dev* 14, 2140-2145.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., und Meyerowitz, E. (1999). *Entwicklungsbiologie* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- Wu, H. M., Yuan, Y., McCarthy, M., und Granger, H. J. (1996). Acidic and basic FGFs dilate arterioles of skeletal muscle through a NO-dependent mechanism. *Am J Physiol* 271, H1087-1093.
- Xiang, C. C., und Chen, Y. (2000). cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnol Adv* 18, 35-46.
- Yajima, M., Takada, M., Takahashi, N., Kikuchi, H., Natori, S., Oshima, Y., und Kurata, S. (2003). A newly established *in vitro* culture using transgenic *Drosophila* reveals functional coupling between the phospholipase A2-generated fatty acid cascade and lipopolysaccharide-dependent activation of the *immune deficiency* (*imd*) pathway in insect immunity. *Biochem J* 371, 205-210.
- Zeeberg, B. R., Feng, W., Wang, G., Wang, M. D., Fojo, A. T., Sunshine, M., Narasimhan, S., Kane, D. W., Reinhold, W. C., Lababidi, S., *et al.* (2003). GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* 4, R28.

- Zelzer, E.,** und Shilo, B. Z. (2000a). Cell fate choices in *Drosophila* tracheal morphogenesis. *Bioessays* 22, 219-226.
- Zelzer, E.,** und Shilo, B. Z. (2000b). Interaction between the bHLH-PAS protein TRACHEALESS and the POU-domain protein DRIFTER, specifies tracheal cell fates. *Mech Dev* 91, 163-173.
- Zelzer, E.,** Wappner, P., und Shilo, B. Z. (1997). The PAS domain confers target gene specificity of *Drosophila* bHLH/PAS proteins. *Genes Dev* 11, 2079-2089.
- Zhu, X.,** Komiya, H., Chirino, A., Faham, S., Fox, G. M., Arakawa, T., Hsu, B. T., und Rees, D. C. (1991). Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 251, 90-93.
- Zinyk, D. L.,** McGonnigal, B. G., und Dearolf, C. R. (1993). *Drosophila* *awdK-pn*, a homologue of the metastasis suppressor gene *nm23*, suppresses the *tum-1* haematopoietic oncogene. *Nat Genet* 4, 195-201.
- Zou, S.,** Meadows, S., Sharp, L., Jan, L. Y., und Jan, Y. N. (2000). Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13726-13731.

6 Tabellenwerk

Das Tabellenwerk faßt die Filterergebnisse nach der statistischen Auswertung der Transkriptomdaten zusammen. Die Referenzierung der Experimente und die Benennung der Gruppen (Spalte 1) sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

6.1 Filterergebnisse nach Expressionswertbestimmung mit dem Verfahren der MASv5

	Probeset	Name	Symbol	biologischer Prozess	molekulare Funktion	zelluläre Komponente
Auswertung für <i>btl</i>-GAL4; UAS-<i>bnl</i> Embryonen						
a	144068_at	Immune induced protein 2	IM2	defense response /// defense response	defense/immunity protein activity /// defense/immunity protein activity	extracellular /// extracellular
a	151209_at	---	CG15065	---	---	---
a	151211_at	---	CG16844	---	---	---
b	144419_at	---	---	---	---	---
b	144891_at	---	CG2444	---	---	---
b	149208_at	---	CG14572	---	---	---
b	151208_at	---	CG15068	---	---	---
c	143391_i_at	Tubulin at 60D	Tub60D	microtubule-based process /// axonogenesis /// axon guidance /// heart development /// response to light /// larval behavior	structural constituent of cytoskeleton /// GTP binding	microtubule /// microtubule /// microtubule /// tubulin
d	149380_at	---	---	---	---	---
e	145412_at	---	CG12656	---	---	---
e	145414_at	---	CG9572	---	---	---
e	147355_at	---	CG17290	---	---	---
e	151301_at	---	CG13315	---	---	---
f	150986_at	---	CG31992	---	---	---
g	143936_at	---	Lcp65Af	---	structural constituent of larval cuticle (sensu Insecta)	---
h	144654_at	---	Tom40	protein-mitochondrial targeting	carrier activity /// protein translocase activity /// Euk_porin;voltage-dependent ion-selective channel activity;1e-137	mitochondrial outer membrane translocase complex
h	148538_at	---	CG18349	---	---	---
h	148736_at	---	CG9040	---	---	---
h	148885_at	---	CG4998	---	serine-type endopeptidase activity /// trypsin;trypsin activity;1.1e-63	---
h	150514_at	---	CG13618	---	---	---
h	150893_f_at	---	CG2229	proteolysis and peptidolysis	serine-type endopeptidase activity /// elastase activity /// trypsin;trypsin activity;1.2e-49	---
h	152168_at	---	CG10686	---	---	---
h	152934_at	---	---	---	---	---
Auswertung der Versuche zur Hypoxieantwort						
a	142395_at	---	CG31839	---	---	extracellular
a	146765_at	---	---	---	---	---
a	147151_at	---	CG18279	---	---	---
a	147685_at	---	CG4269	---	---	---
a	148103_at	drosomycin-5	dro5	defense response	defense/immunity protein activity	---
a	148885_at	---	CG4998	---	serine-type endopeptidase activity /// trypsin;trypsin activity;1.1e-63	---
a	149203_at	---	CG14569	---	---	---
a	149204_at	---	CG14568	---	---	---
a	149208_at	---	CG14572	---	---	---
a	149752_at	---	---	---	---	---

a	150533_at	---	CG13641	---	---	---
a	151268_i_at	---	CG13069	---	---	---
a	151269_r_at	---	CG13069	---	---	---
a	152168_at	---	CG10686	---	---	---
k-Means-Gruppierung aus ANOVA						
Cluster 4	141286_at	---	CG5568	---	long-chain fatty acid transporter activity /// AMP-binding;catalytic activity;1.4e-79	---
Cluster 4	141300_at	Protein tyrosine phosphatase 61F	Ptp61F	protein amino acid dephosphorylation /// protein amino acid dephosphorylation /// axon guidance	protein-tyrosine-phosphatase activity /// protein-tyrosine-phosphatase activity /// protein-tyrosine-phosphatase activity	nucleus /// cytoplasm
Cluster 4	141400_at	---	Ranbp9	---	RAN protein binding /// IBN_NT;protein transporter activity;5.8e-18	---
Cluster 4	141527_at	---	Tequila	proteolysis and peptidolysis	serine-type endopeptidase activity /// serine-type endopeptidase activity /// trypsin activity /// pancreatic elastase activity /// CBM_14;chitin binding;0.0029 /// CBM_14;chitin binding;1e-16	---
Cluster 4	141565_at	three rows	thr	mitotic chromosome segregation /// mitotic chromosome segregation /// morphogenesis of an epithelium /// peripheral nervous system development /// tracheal system development (sensu Insecta) /// foregut morphogenesis /// hindgut morphogenesis /// Malpighian tubule morphogenesis /// head involution /// mitotic sister chromatid separation	---	---
Cluster 4	141608_at	Inner centromere protein	Incenp	---	---	---
Cluster 4	141745_at	Phosphoethanolamineyridyltransferase	Pect	---	ethanolamine-phosphate cytidyltransferase activity /// CTP_transf_2;nucleotidyltransferase activity;1.9e-17 /// CTP_transf_2;nucleotidyltransferase activity;2.2e-17 /// CTP_transf_2;nucleotidyltransferase activity;4.7e-19 /// CTP_transf_2;nucleotidyltransferase activity;9.7e-11	---
Cluster 4	141764_at	---	CG6322	mRNA splicing /// RNA splicing	pre-mRNA splicing factor activity	spliceosome complex /// snRNP U4 /// snRNP U6 /// small nuclear ribonucleoprotein complex
Cluster 4	142027_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	142037_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	142039_s_at	groucho	gro	negative regulation of transcription from Pol II promoter /// neurogenesis /// neurogenesis /// sex determination, primary response to X:A ratio /// negative regulation of transcription /// negative	DNA binding /// transcription corepressor activity /// transcription corepressor activity /// transcription corepressor activity	nucleus /// nucleus

				regulation of transcription /// negative regulation of frizzled signaling pathway		
Cluster 4	142081_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	142216_at	---	CG32782	---	pkinase;protein kinase activity;3.1e-13	---
Cluster 4	142262_at	---	CG1623	---	---	---
Cluster 4	142544_at	---	CG7372	---	---	---
Cluster 4	142581_at	Transportin	Trn	protein-nucleus import	protein carrier activity /// IBN_NT;protein transporter activity;1.8e-15	nuclear pore
Cluster 4	142604_at	---	CG33095	---	---	---
Cluster 4	142768_at	---	CG7407	---	---	---
Cluster 4	142833_at	---	CG4454	---	---	---
Cluster 4	142838_at	bicoid	bcd	regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription from Pol II promoter /// regulation of translation /// maternal determination of anterior/posterior axis, embryo /// maternal determination of anterior/posterior axis, embryo /// determination of anterior/posterior axis, embryo /// determination of anterior/posterior axis, embryo /// negative regulation of translation	specific RNA polymerase II transcription factor activity /// morphogen activity /// translation regulator activity /// homeobox;transcription factor activity;3.7e-24	nucleus
Cluster 4	142865_at	---	CG5589	---	RNA binding /// ATP dependent RNA helicase activity /// DEAD;ATP binding;4.8e-59	---
Cluster 4	142880_at	---	CG1745	---	---	---
Cluster 4	142922_at	---	CG4617	---	---	---
Cluster 4	142924_at	wee	wee	protein amino acid phosphorylation /// regulation of mitosis /// mitotic checkpoint	protein kinase activity /// protein-tyrosine kinase activity /// protein-tyrosine kinase activity	nucleus
Cluster 4	143090_at	Blastoderm-specific gene 25D	Bsg25D	---	---	---
Cluster 4	143267_at	male-specific lethal 3	msl-3	dosage compensation /// dosage compensation /// dosage compensation, by hyperactivation of X chromosome /// dosage compensation, by hyperactivation of X chromosome	chromatin binding /// chromatin binding /// RNA binding /// protein binding /// transcription regulator activity	nucleus /// chromosome /// dosage compensation complex (sensu Drosophila)
Cluster 4	143538_at	Topoisomerase 1	Top1	(larval Insecta) /// female gamete generation /// embryonic morphogenesis	DNA topoisomerase type I activity /// DNA topoisomerase type I activity /// DNA topoisomerase type I activity /// Topoisomer_I_N;DNA binding;1.3e-154	nucleus /// cytoplasm
Cluster 4	143561_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	143753_at	retained	retn	negative regulation of transcription from Pol II promoter /// female gamete generation /// salivary gland development /// salivary gland morphogenesis /// gliogenesis	DNA binding /// DNA binding /// transcription factor activity /// transcriptional repressor activity	nucleus
Cluster 4	143755_at	males absent on the first	mof	dosage compensation /// dosage compensation /// dosage compensation /// dosage compensation, by hyperactivation of X chromosome	chromatin binding /// RNA binding /// histone acetyltransferase activity /// histone acetyltransferase activity /// histone	dosage compensation complex (sensu Drosophila)

				by hyperactivation of X chromosome /// histone acetylation /// histone acetylation /// peptidyl-lysine acetylation	acetyltransferase activity /// H3/H4 histone acetyltransferase activity /// lysine N-acetyltransferase activity /// protein binding /// histone lysine acetyltransferase activity (H4-K16 specific)	
Cluster 4	143834_at	heat shock construct of Sigris	CycB3	cytokinesis after mitosis /// mitotic spindle assembly	cyclin-dependent protein kinase regulator activity	microtubule cytoskeleton
Cluster 4	143910_at	---	Cbl	EGF receptor signaling pathway /// negative regulation of EGF receptor activity /// negative regulation of EGF receptor activity /// dorsal/ventral axis determination, follicular epithelium (sensu Insecta) /// dorsal/ventral axis specification /// negative regulation of EGF receptor signaling pathway	Cbl_N;signal transducer activity;4.6e-107	---
Cluster 4	143959_at	---	D19B	---	---	---
Cluster 4	143976_at	Protein phosphatase 19C	Pp4-19C	M-phase specific microtubule process /// protein amino acid dephosphorylation /// protein amino acid dephosphorylation /// microtubule-based process /// regulation of mitotic cell cycle	protein serine/threonine phosphatase activity /// protein serine/threonine phosphatase activity /// 3.1.3.16;CTD phosphatase activity;6.28e-119 /// Metallophos;hydrolase activity;8.8e-44	nucleus /// cytoplasm /// centrosome /// microtubule cytoskeleton
Cluster 4	143982_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	144023_at	---	Rep1	DNA fragmentation /// anti-apoptosis	apoptosis regulator activity	---
Cluster 4	144064_at	---	Bub1	protein amino acid phosphorylation /// mitotic spindle checkpoint /// mitotic spindle checkpoint /// regulation of exit from mitosis /// regulation of exit from mitosis	protein kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity	kinetochore /// outer kinetochore of condensed chromosome
Cluster 4	144078_at	---	CG17829	---	---	---
Cluster 4	144083_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	144645_at	---	CG2079	---	---	---
Cluster 4	144997_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	145235_at	---	CG5162	---	structural molecule activity /// lipase;catalytic activity;1e-56	---
Cluster 4	145257_at	---	CG8188	---	ubiquitin conjugating enzyme activity	---
Cluster 4	145381_at	---	CG14210	---	---	---
Cluster 4	145527_at	---	CG13690	---	ribonuclease H1 activity /// ribonuclease H1 activity /// RNase_HII;RNA binding;1.7e-52	---
Cluster 4	145732_at	---	CG3604	---	serine-type endopeptidase inhibitor activity	---
Cluster 4	145889_at	---	Pez	protein amino acid dephosphorylation	protein-tyrosine-phosphatase activity /// protein-tyrosine-phosphatase activity /// cytoskeletal protein binding	Band_41;cytoskeleton;5.7e-15
Cluster 4	145935_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	146238_at	---	CG32955	---	kinesin;motor activity;4.2e-115	---
Cluster 4	146514_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	146576_at	burgundy	bur	GMP biosynthesis	GMP synthase activity /// GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) activity /// GATase;catalytic activity;5.1e-48	---

Cluster 4	146862_at	---	CG13742	---	---	---
Cluster 4	146882_at	---	ced-6	---	---	---
Cluster 4	146968_at	---	CG12343	---	---	---
Cluster 4	147078_at	---	CG8841	---	---	---
Cluster 4	147107_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	147175_at	Saccharomyces cerevisiae UAS construct a of Sotillos	RacGAP50C	cytokinesis /// Rho protein signal transduction /// cell proliferation /// negative regulation of Wnt receptor signaling pathway /// DAG_PE-bind;intracellular signaling cascade;6.2e-10	signal transducer activity /// GTPase activator activity /// Rho GTPase activator activity /// diacylglycerol binding	---
Cluster 4	147193_at	---	CG8589	---	---	---
Cluster 4	147382_at	lethal with a checkpoint kinase	lack	ubiquitin cycle /// transforming growth factor beta receptor signaling pathway	ubiquitin-protein ligase activity /// ubiquitin-protein ligase activity	---
Cluster 4	147915_at	Enhancer of bithorax	E(bx)	nucleosome assembly /// hemocyte development	AT_hook;DNA binding;0.018	nucleosome remodeling complex
Cluster 4	148124_at	---	CG1120	---	---	---
Cluster 4	148159_at	archipelago	ago	regulation of mitosis /// cyclin catabolism	ubiquitin-protein ligase activity	---
Cluster 4	148737_at	---	CG17361	---	---	---
Cluster 4	149011_at	---	Med21	regulation of transcription from Pol II promoter	RNA polymerase II transcription mediator activity /// RNA polymerase II transcription mediator activity	mediator complex /// mediator complex
Cluster 4	149107_at	---	CG6951	---	dCMP deaminase activity /// dCMP_cyt_deam;zinc ion binding;2e-32	---
Cluster 4	149186_at	Makorin 1	Mkrl1	---	zf-CCCH;nucleic acid binding;7.8e-06	---
Cluster 4	149204_at	---	CG14568	---	---	---
Cluster 4	149207_at	---	CG14566	---	---	---
Cluster 4	149420_at	---	CG1943	---	---	---
Cluster 4	149600_at	---	CG5358	---	protein-arginine N-methyltransferase activity	---
Cluster 4	149747_at	---	CG17738	---	---	---
Cluster 4	149794_at	---	CG6188	---	glycine N-methyltransferase activity	---
Cluster 4	150018_at	---	CG14883	---	---	---
Cluster 4	150306_at	---	CG5892	---	Acyl_transf_3;transferase activity, transferring groups other than amino-acyl groups;3.6e-05	---
Cluster 4	150600_at	---	CG4730	---	---	---
Cluster 4	150742_at	Mig-2-like	Mtl	morphogenesis of an epithelium /// dorsal closure	small monomeric GTPase activity /// Rho small monomeric GTPase activity /// Rho small monomeric GTPase activity	---
Cluster 4	150748_at	---	CG12877	---	Exonuclease;exonuclease activity;3.8e-25	---
Cluster 4	151397_at	---	CG15345	---	---	---
Cluster 4	151444_at	---	CG4440	---	---	---
Cluster 4	151615_at	---	CG7372	---	---	---
Cluster 4	151660_at	swallow	swa	mRNA localization, intracellular /// pole plasm mRNA localization /// bicoid mRNA localization /// bicoid mRNA localization	RNA binding /// RNA binding /// dynein binding	---
Cluster 4	151665_at	---	CG4532	---	actin binding	---
Cluster 4	151881_at	---	CG10238	Mo-molybdopterin cofactor biosynthesis	---	molybdopterin converting factor
Cluster 4	151935_at	Toll	Tl	defense response /// immune response /// antimicrobial humoral response (sensu	transmembrane receptor activity	integral to plasma membrane /// integral to membrane

				Invertebrata) /// antibacterial polypeptide induction /// antifungal humoral response (sensu Invertebrata) /// antifungal polypeptide induction /// T1 signaling pathway /// response to bacteria /// response to fungi /// dorsal/ventral axis specification /// dorsal/ventral axis specification		
Cluster 4	151937_at	---	CG1213	---	glucose transporter activity /// sugar_tr;transporter activity;8.9e-82	---
Cluster 4	152190_at	---	phtf	---	---	---
Cluster 4	152191_at	---	Sas10	---	---	---
Cluster 4	152241_at	cinnamon	cin	embryonic development (sensu Insecta) /// Mo- molybdopterin cofactor biosynthesis /// Mo- molybdopterin cofactor biosynthesis	---	---
Cluster 4	152297_at	---	CG11228	protein amino acid phosphorylation	receptor signaling protein serine/threonine kinase activity /// receptor signaling protein serine/threonine kinase activity /// pkinase;protein kinase activity;1e-89	---
Cluster 4	152467_at	---	CG17509	---	---	---
Cluster 4	152572_at	---	CG3045	---	pseudouridylate synthase activity	---
Cluster 4	153153_at	discontinuous actin hexagon	dah	cytokinesis, actomyosin ring formation /// cellularization	---	extrinsic to membrane
Cluster 4	153420_at	Neosin	Neos	---	RNA binding /// rrm;nucleic acid binding;1e-10	---
Cluster 4	153471_at	---	CG1815	---	protein kinase C binding	---
Cluster 4	153480_at	Microtubule- associated protein 60	Map60	microtubule-based process	microtubule binding	centrosome /// centrosome /// centrosome /// microtubule associated complex /// microtubule associated complex
Cluster 4	153610_at	---	CG3488	---	lipase activity	---
Cluster 4	153614_at	ripped pocket	rpk	---	sodium channel activity /// sodium channel activity /// amiloride-sensitive sodium channel activity	---
Cluster 4	153626_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	153650_at	---	CG5175	---	---	---
Cluster 4	153726_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	153742_at	polo	polo	cytokinesis /// protein amino acid phosphorylation /// male meiosis chromosome segregation /// mitosis /// mitosis /// male meiosis /// protein localization	protein kinase activity /// protein kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity	outer kinetochore of condensed chromosome /// cytoplasm /// centrosome /// spindle
Cluster 4	153756_at	---	CG31156	---	---	---
Cluster 4	153788_at	---	CG10354	---	5'-3' exoribonuclease activity /// XRN_N;exonuclease activity;8e-189	---
Cluster 4	153804_at	---	CG11881	---	---	---
Cluster 4	153805_at	---	CG18600	---	---	---
Cluster 4	153808_at	---	CG17249	---	---	---
Cluster 4	153819_at	---	Nopp140	nucleologenesis	---	nucleolus /// nucleolus
Cluster 4	153857_at	plexin A	plexA	---	axon guidance receptor activity /// semaphorin	---

					receptor activity /// semaphorin receptor activity /// PSI;receptor activity;1.3e-12	
Cluster 4	153872_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	153890_at	pimples	pim	mitotic sister chromatid separation /// mitotic sister chromatid separation	---	---
Cluster 4	153942_at	---	CG8924	---	DNA binding /// BTB;protein binding;2.7e-22	---
Cluster 4	153947_at	twine	twe	protein amino acid dephosphorylation /// protein amino acid dephosphorylation /// male meiotic spindle assembly (sensu Animalia) /// female meiotic spindle assembly (sensu Animalia) /// male meiosis /// spermatogenesis /// spermatogenesis /// regulation of syncytial blastoderm mitotic cell cycle /// meiotic G2/M1 transition /// meiotic G2/M1 transition /// embryonic morphogenesis	protein-tyrosine-phosphatase activity /// protein-tyrosine-phosphatase activity /// protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity	microtubule cytoskeleton
Cluster 4	153959_at	maelstrom	mael	cytoskeleton organization and biogenesis /// oocyte nucleus migration /// mRNA localization, intracellular /// pole plasm mRNA localization (sensu Insecta)	---	polar granule
Cluster 4	153983_at	---	CG4880	---	---	---
Cluster 4	154013_at	---	CG1753	---	cystathionine beta-synthase activity /// PALP;lyase activity;1.4e-106	---
Cluster 4	154082_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	154094_at	---	gp210	---	---	integral to membrane
Cluster 4	154098_at	RNA polymerase II 140kD subunit	RpII140	transcription from Pol II promoter /// transcription from Pol II promoter	DNA-directed RNA polymerase activity /// DNA-directed RNA polymerase activity	DNA-directed RNA polymerase II, core complex /// DNA-directed RNA polymerase II, core complex
Cluster 4	154100_at	---	CG1244	---	---	---
Cluster 4	154133_at	---	CG15817	protein deubiquitination	ubiquitin-specific protease activity /// UCH;cysteine-type endopeptidase activity;2.5e-19	---
Cluster 4	154177_at	Cyclin B	CycB	G2/M transition of mitotic cell cycle /// mitotic anaphase B /// cytokinesis after mitosis /// cytokinesis /// mitotic chromosome movement /// microtubule/kinetochore interaction	cyclin-dependent protein kinase regulator activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity	nuclear cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex /// pole plasm
Cluster 4	154179_at	---	CG8478	---	---	---
Cluster 4	154243_at	---	CG15514	---	zf-BED;DNA binding;2.4e-11	---
Cluster 4	154347_at	fallen	fal	gastrulation	GTPase activity	---
Cluster 4	154361_at	---	CG18769	---	---	---
Cluster 4	154370_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	154401_at	---	CG6854	---	transcription factor activity /// CTP synthase activity /// BESS;DNA binding;3e-17 ///	---

					GATase;catalytic activity;6.6e-64	
Cluster 4	154412_at	Suppressor of variegation 2-10	Su(var)2-10	chromosome organization and biogenesis (sensu Eukarya) /// chromosome organization and biogenesis (sensu Eukarya) /// imaginal disc growth /// eye morphogenesis (sensu Drosophila) /// eye morphogenesis (sensu Drosophila) /// chromosome condensation /// regulation of protein catabolism /// regulation of JAK-STAT cascade	DNA binding /// DEAD/H-box RNA helicase binding	chromosome, telomeric region /// nucleus /// nucleus /// nuclear lamina /// nucleoplasm /// nucleoplasm /// polytene chromosome /// cytoplasm /// cytoplasm /// cytoplasm
Cluster 4	154424_at	---	CG8062	---	monocarboxylic acid transporter activity	---
Cluster 4	154428_at	gilgamesh	gish	protein amino acid phosphorylation /// spermatogenesis /// glia cell migration	casein kinase I activity /// casein kinase I activity /// pkinase;protein kinase activity;1.5e-29 /// pkinase;protein kinase activity;7.6e-28	---
Cluster 4	154437_at	---	CG31365	---	nucleic acid binding	nucleus
Cluster 4	154464_at	non-claret disjunctional	ncd	meiotic spindle assembly /// microtubule-based movement /// chromosome segregation /// centrosome separation /// centrosome separation	minus-end-directed microtubule motor activity /// kinesin motor activity	kinesin complex /// minus-end kinesin complex
Cluster 4	154485_at	kelch	kel	female gamete generation /// ovarian ring canal formation /// ovarian ring canal formation /// cytoplasmic transport, nurse cell to oocyte	actin binding /// actin binding /// BTB;protein binding;2.7e-45	cell cortex /// ring canal (sensu Drosophila) /// ring canal (sensu Drosophila)
Cluster 4	154492_at	---	CG18212	---	---	---
Cluster 4	154516_at	smaug	smg	negative regulation of translation	translation repressor activity, nucleic acid binding /// RNA binding /// mRNA 3' UTR binding /// protein binding /// translation repressor activity /// translation repressor activity	---
Cluster 4	154579_at	---	CG30426	---	MBD;DNA binding;1.7e-10	---
Cluster 4	154585_at	absent, small, or homeotic discs 2	ash2	wing morphogenesis /// chromatin-mediated maintenance of transcription	---	nucleus /// nucleus
Cluster 4	154597_at	---	msb11	---	---	---
Cluster 4	154599_at	---	CG2199	---	---	---
Cluster 4	154649_at	---	Sirt7	---	SIR2;DNA binding;5e-12	---
Cluster 4	154654_at	pipsqueak	psq	pole plasm assembly	DNA binding /// BTB;protein binding;1.2e-31	nucleus
Cluster 4	154659_at	Chromatin assembly factor 1 subunit	Caf1	nucleosome assembly /// DNA replication dependent nucleosome assembly /// chromatin silencing	chromatin binding /// histone-specific chaperone activity /// methyltransferase activity	nucleus /// chromatin assembly complex /// nucleosome remodeling complex
Cluster 4	154700_at	---	---	---	---	---
Cluster 4	154702_at	---	CG4973	---	zf-CCCH;nucleic acid binding;1.4e-09	---
Cluster 4	154706_at	greatwall	gwl	protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation ///	protein kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity	---

				mitosis		
Cluster 4	154749_at	---	CG2258	---	---	---
Cluster 4	154779_at	nicastrin	nct	membrane protein ectodomain proteolysis /// membrane protein ectodomain proteolysis /// cytoskeleton organization and biogenesis /// N signaling pathway /// N signaling pathway /// N receptor processing /// N receptor processing	---	plasma membrane /// integral to membrane
Cluster 4	154815_at	Minichromosome maintenance 7	Mcm7	pre-replicative complex formation and maintenance /// pre- replicative complex formation and maintenance	chromatin binding /// chromatin binding /// MCM;DNA binding;1.2e-297	pre-replicative complex /// pre- replicative complex
Cluster 4	154832_at	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 98DE	Hrb98DE	---	RNA binding /// RNA binding /// rrm;nucleic acid binding;1.1e-18	ribonucleoprotein complex /// ribonucleoprotein complex /// ribonucleoprotein complex /// ribonucleoprotein complex /// heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex
Cluster 4	154844_at	cdc2	cdc2	regulation of cell cycle /// G1/S transition of mitotic cell cycle /// G2/M transition of mitotic cell cycle /// G2/M transition of mitotic cell cycle /// protein amino acid phosphorylation /// male meiosis I /// spermatogenesis /// meiotic G2/M transition /// hyperphosphorylation of RNA polymerase II /// neuroblast cell division	protein serine/threonine kinase activity /// cyclin- dependent protein kinase activity /// cyclin-dependent protein kinase activity	nucleus
Cluster 4	154931_at	---	CG12391	---	AT_hook;DNA binding;0.64	---
Cluster 4	154980_at	---	CG11596	---	---	---
Cluster 4	155042_at	scribbled	scrib	regulation of cell cycle /// antibacterial polypeptide induction /// dorsal closure /// asymmetric protein localization /// cell proliferation /// negative regulation of cell proliferation /// morphogenesis of embryonic epithelium /// establishment and/or maintenance of polarity of embryonic epithelium /// morphogenesis of follicular epithelium /// establishment and/or maintenance of polarity of follicular epithelium /// morphogenesis of larval imaginal disc epithelium /// establishment and/or maintenance of polarity of larval imaginal disc epithelium ///	---	septate junction /// septate junction /// septate junction /// apicolateral plasma membrane /// lateral plasma membrane

				establishment and/or maintenance of epithelial cell polarity /// establishment and/or maintenance of epithelial cell polarity		
Cluster 4	155060_at	---	CG8223	---	---	---
Cluster 4	155068_at	Cyclin A	CycA	G2/M transition of mitotic cell cycle /// mitosis /// mitosis /// regulation of mitosis /// peripheral nervous system development /// mitotic sister chromatid separation /// negative regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	cyclin-dependent protein kinase regulator activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity	nucleus /// cytoplasm /// nuclear cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex /// fusome /// spectrosome
Cluster 4	155082_at	fizzy	fzy	cyclin catabolism	---	---
Cluster 4	155096_at	---	CG17149	---	---	---
Cluster 4	155124_at	apontic	apt	regulation of transcription from Pol II promoter /// negative regulation of oskar mRNA translation /// negative regulation of oskar mRNA translation /// heart development	RNA polymerase II transcription factor activity /// RNA binding	---
Cluster 4	155125_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	141232_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	141252_at	DEAD box protein 45A	Dbp45A	---	ATP dependent RNA helicase activity /// ATP dependent RNA helicase activity	---
Cluster 9	141258_at	---	CG7845	---	---	---
Cluster 9	141272_at	---	CG9536	---	---	---
Cluster 9	141323_at	---	CG10200	---	---	---
Cluster 9	141379_at	Antigen 5-related	Ag5r	---	---	extracellular
Cluster 9	141408_at	---	CG17930	---	sugar_tr;transporter activity;8.2e-06	---
Cluster 9	141410_at	---	CG9307	---	chitinase activity /// Glyco_hydro_18;hydrolase activity;2.5e-141	---
Cluster 9	141578_at	---	CG17278	---	---	---
Cluster 9	141658_at	---	CG5853	---	ATP-binding cassette (ABC) transporter activity	---
Cluster 9	142016_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	142097_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	142189_at	Cytochrome P450-6a8	Cyp6a8	p450;electron transport;3.2e-112	cytochrome P450 activity /// cytochrome P450 activity	microsome /// membrane
Cluster 9	142253_at	---	CG10560	---	---	---
Cluster 9	142272_at	---	Ugt86De	---	glucuronosyltransferase activity /// UDPGT;transferase activity, transferring hexosyl groups;1.7e-67	---
Cluster 9	142297_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	142303_at	---	Mdh	pyruvate metabolism /// malate metabolism	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP+) activity /// malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP+) activity /// malic;malic enzyme activity;1e-125	mitochondrion
Cluster 9	142340_at	Fumarylacetoacetase	Faa	---	fumarylacetoacetase activity /// FAA_hydrolase;catalytic activity;6.7e-91	---
Cluster 9	142359_at	---	CG30360	---	alpha-amylase;alpha-amylase activity;9.9e-105	---
Cluster 9	142369_at	Na channel protein 60E	NaCP60E	sodium ion transport /// olfactory behavior	voltage-gated sodium channel activity /// voltage-gated sodium channel activity /// ion_trans;ion channel activity;1.1e-58	plasma membrane

Cluster 9	142434_at	Troponin C-akin-1	Tina-1	---	---	---
Cluster 9	142538_at	---	---	---	glutathione transferase activity	---
Cluster 9	142703_at	Adenylate kinase-3	Adk3	ADP biosynthesis	adenylate kinase activity /// adenylate kinase activity /// nucleoside-triphosphate-adenylate kinase activity /// ADK;ATP binding;2.1e-58	mitochondrial matrix
Cluster 9	142949_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	142969_at	Cystatin-like	Cys	---	cysteine protease inhibitor activity /// cysteine protease inhibitor activity	---
Cluster 9	142988_at	---	CG6770	---	---	---
Cluster 9	143001_at	---	CG5780	---	---	---
Cluster 9	143242_at	Larval visceral protein H	LvpH	glucose metabolism	alpha-glucosidase activity /// alpha-glucosidase activity	---
Cluster 9	143782_at	Cytochrome P450-4p1	Cyp4p1	---	cytochrome P450 activity /// cytochrome P450 activity	microsome /// membrane
Cluster 9	143823_at	Esterase-9	Est9	---	carboxylesterase activity /// carboxylesterase activity	---
Cluster 9	144101_at	UDP-glycosyltransferase 37c1	Ugt37c1	---	ecdysteroid UDP-glucosyl/UDP-glucuronosyl transferase activity /// glucuronosyltransferase activity	---
Cluster 9	144241_at	---	CG11902	---	AT_hook;DNA binding;1.9	---
Cluster 9	144266_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	144735_at	---	CG12119	---	---	---
Cluster 9	144911_at	---	Chrac-16	---	CBFD_NFYB_HMF;DNA binding;3.2e-22	chromatin accessibility complex
Cluster 9	144918_at	---	CG32656	---	CBM_14;chitin binding;2.9e-06	---
Cluster 9	145049_at	---	CG11585	---	---	---
Cluster 9	145086_at	---	CG9517	---	glucose dehydrogenase activity /// GMC_oxred_N;oxidoreductase activity;5.8e-67	---
Cluster 9	145099_at	---	CG33177	---	glutathione transferase activity	---
Cluster 9	145239_at	---	CG10597	---	---	---
Cluster 9	145377_at	---	CG14219	---	Acyl_transf_3;transferase activity, transferring groups other than amino-acyl groups;9.2e-05	---
Cluster 9	145412_at	---	CG12656	---	---	---
Cluster 9	145414_at	---	CG9572	---	---	---
Cluster 9	145471_at	---	CG1718	---	ATP-binding cassette (ABC) transporter activity	---
Cluster 9	145487_at	---	CG12576	---	---	---
Cluster 9	145637_at	---	CG3609	---	GFO_IDH_MocA;oxidoreductase activity;2.1e-27	---
Cluster 9	145728_at	---	CG16704	---	serine-type endopeptidase inhibitor activity	---
Cluster 9	145744_at	---	CG15423	---	---	---
Cluster 9	145813_at	---	Cyp28d2	p450;electron transport;4.3e-61	cytochrome P450 activity /// cytochrome P450 activity	microsome /// membrane
Cluster 9	145956_at	---	CG5958	---	retinal binding	---
Cluster 9	145979_at	---	CG7203	---	---	---
Cluster 9	146129_at	---	CG5731	---	alpha-N-acetylgalactosaminidase activity /// Melibiase;hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds;2.1e-07	---
Cluster 9	146182_at	---	CG7296	---	---	---
Cluster 9	146183_at	---	CG7294	---	---	---
Cluster 9	146272_at	---	CG16996	proteolysis and peptidolysis	serine-type endopeptidase activity /// chymotrypsin activity /// trypsin;trypsin activity;3.3e-47	---
Cluster 9	146528_at	---	CG10659	---	---	---
Cluster 9	146588_at	---	CG17570	---	---	---
Cluster 9	146644_at	---	CG30440	---	guanyl-nucleotide exchange	---

					factor activity	
Cluster 9	146707_at	Tetraspanin 42Ec	Tsp42Ec	---	---	integral to membrane
Cluster 9	146758_at	---	CG12826	---	---	---
Cluster 9	146832_at	---	PGRP-SC2	defense response /// immune response	peptidoglycan recognition activity /// peptidoglycan recognition activity /// Amidase_2;N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity;6.2e-62	extracellular /// integral to plasma membrane
Cluster 9	146925_at	---	CG18011	---	---	---
Cluster 9	146978_s_at	---	CG18240	p450;electron transport;3.3e-57	---	---
Cluster 9	146987_at	---	CG13227	---	---	---
Cluster 9	147028_i_at	---	CG30035	carbohydrate transport	glucose transporter activity /// sugar_tr;transporter activity;6.4e-99	integral to membrane
Cluster 9	147029_s_at	---	CG30035	carbohydrate transport	glucose transporter activity /// sugar_tr;transporter activity;6.4e-99	integral to membrane
Cluster 9	147170_at	---	CG13339	---	---	---
Cluster 9	147242_at	---	CG8157	---	---	---
Cluster 9	147286_at	---	CG7798	antimicrobial humoral response (sensu Invertebrata)	lysozyme activity /// lysozyme activity	lys;extracellular;5.6 e-47
Cluster 9	147292_at	---	CG15709	---	---	---
Cluster 9	147334_at	---	CG5550	---	---	extracellular matrix
Cluster 9	147336_at	---	CG6426	---	---	---
Cluster 9	147352_at	---	CG15918	---	Polysacc_deacet;hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds;2.2e-14	---
Cluster 9	147552_at	---	CG33008	---	trypsin;trypsin activity;9.2e-74	---
Cluster 9	147578_at	---	CG9993	---	long-chain fatty acid transporter activity /// AMP-binding; catalytic activity;2.1e-94	---
Cluster 9	147749_at	---	CG13545	---	---	---
Cluster 9	147771_at	yellow-d	yellow-d	---	---	---
Cluster 9	147793_at	---	CG4019	---	water channel activity /// MIP;transporter activity;5.8e-48	---
Cluster 9	147871_at	---	CG11413	---	---	---
Cluster 9	147995_at	---	CG12011	---	---	---
Cluster 9	148134_at	---	CG14983	---	---	---
Cluster 9	148160_at	---	CG1265	---	---	---
Cluster 9	148166_at	---	CG1319	---	electron carrier activity /// fer2;electron transporter activity;0.00061	mitochondrial matrix
Cluster 9	148203_at	---	CG32237	---	---	---
Cluster 9	148222_at	---	CG4835	---	CBM_14;chitin binding;7.6e-15	---
Cluster 9	148356_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	148484_at	---	CG6767	Pribosyltran;nucleoside metabolism;6.8e-38	ribose-phosphate diphosphokinase activity	---
Cluster 9	148599_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	148620_at	---	CG17826	---	CBM_14;chitin binding;2.3e-10	---
Cluster 9	148640_at	---	CG11529	proteolysis and peptidolysis	serine-type endopeptidase activity /// chymotrypsin activity /// trypsin;trypsin activity;5.9e-58	---
Cluster 9	148678_at	---	CG14120	---	Endonuclease;nucleic acid binding;7.4e-25	---
Cluster 9	149052_at	---	CG9449	---	acid phosphatase activity	---
Cluster 9	149102_at	---	CG17145	---	structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta) /// CBM_14;chitin binding;0.061	---
Cluster 9	149231_at	---	CG11438	dephosphorylation	phosphatidate phosphatase activity /// phosphatidate phosphatase activity	---
Cluster 9	149642_at	---	CG31272	transport	transporter activity	synaptic vesicle membrane

Cluster 9	149647_at	---	CG14693	---	---	---
Cluster 9	149657_at	---	CG14696	arrestin;signal transduction;1.7e-46	---	---
Cluster 9	149699_at	---	CG6830	---	---	---
Cluster 9	149759_at	Glutathione S transferase D5	GstD5	glutathione conjugation reaction	glutathione transferase activity /// glutathione transferase activity	---
Cluster 9	149839_f_at	---	CG14377	---	---	---
Cluster 9	149914_at	Senescence marker protein-30	smp-30	---	---	---
Cluster 9	150017_at	---	CG10405	proteolysis and peptidolysis	serine-type endopeptidase activity /// trypsin activity	---
Cluster 9	150087_at	---	CG14324	---	---	---
Cluster 9	150088_at	---	CG14326	---	---	---
Cluster 9	150112_at	---	CG7785	---	---	---
Cluster 9	150223_at	---	CG4562	---	ATP-binding cassette (ABC) transporter activity	---
Cluster 9	150417_at	---	CG17119	L-cystine transport	L-cystine transporter activity	lysosomal membrane
Cluster 9	150423_at	---	CG17109	---	aminoacylase activity /// Peptidase_M20;metallopeptidase activity;1.5e-92	---
Cluster 9	150565_at	---	CG11852	---	---	---
Cluster 9	150566_at	---	CG11854	---	---	---
Cluster 9	150574_at	---	CG33091	---	---	---
Cluster 9	150583_at	---	CG31436	---	---	---
Cluster 9	150586_at	---	CG10553	---	---	---
Cluster 9	150603_at	---	CG5028	tricarboxylic acid cycle	isocitrate dehydrogenase (NAD+) activity /// isodh;oxidoreductase activity;1.3e-64	mitochondrion /// mitochondrial matrix
Cluster 9	150683_at	---	CG6403	---	CBM_14;chitin binding;0.026	---
Cluster 9	150831_at	Odorant-binding protein 99a	Obp99a	---	odorant binding	---
Cluster 9	150955_at	---	CG2191	---	sodium dependent multivitamin transporter activity /// SSF;transporter activity;1.2e-08	---
Cluster 9	151040_f_at	---	CG14374	---	---	---
Cluster 9	151206_i_at	---	CG15126	---	---	---
Cluster 9	151217_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	151399_at	---	CG15352	---	---	---
Cluster 9	151603_at	---	CG7053	---	---	---
Cluster 9	151694_at	---	CG17090	protein amino acid phosphorylation	protein kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity	---
Cluster 9	151761_at	---	MTF-1	transcription /// metal ion homeostasis	transcription factor activity /// specific RNA polymerase II transcription factor activity	nucleus /// nucleoplasm
Cluster 9	151895_at	---	Rh50	---	Ammonium_transp;ammonium transporter activity;8.4e-59	---
Cluster 9	151908_at	---	CG8128	---	---	---
Cluster 9	151962_at	---	CG5597	---	---	---
Cluster 9	152088_at	---	CG5508	plasma membrane organization and biogenesis /// phospholipid biosynthesis	glycerol-3-phosphate O-acyltransferase activity /// Acyltransferase;acyltransferase activity;4.2e-21	mitochondrial outer membrane
Cluster 9	152100_at	---	CG31705	---	---	---
Cluster 9	152151_at	---	CG3902	---	short-branched-chain-acyl-CoA dehydrogenase activity /// Acyl-CoA_dh_N;acyl-CoA dehydrogenase activity;1.1e-35 /// 1.3.99.2;butyryl-CoA dehydrogenase activity;2.51e-126	---
Cluster 9	152155_at	---	CG9338	---	---	---
Cluster 9	152183_at	---	CG4680	---	---	---
Cluster 9	152189_at	---	Keap1	---	actin binding /// BTB;protein binding;1.7e-36	---
Cluster 9	152225_at	kraken	kraken	digestion /// response to toxin	serine hydrolase activity	---
Cluster 9	152261_at	Carbonic	CAH1	---	carbonate dehydratase	---

		anhydrase 1			activity	
Cluster 9	152263_at	---	CG9312	---	---	---
Cluster 9	152286_at	---	CG4928	---	---	---
Cluster 9	152375_at	midline fasciclin	mfas	axonogenesis /// Fasciclin;cell adhesion;1.3e-14	---	plasma membrane
Cluster 9	152457_at	---	CG3672	---	---	---
Cluster 9	152513_at	---	CG10513	---	---	---
Cluster 9	152531_at	Ornithine decarboxylase 1	Odc1	polyamine biosynthesis	ornithine decarboxylase activity	---
Cluster 9	152534_at	---	CG9331	---	oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors /// 2-Hacid_DH;oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor;2.7e-20	---
Cluster 9	152540_at	---	CG11912	proteolysis and peptidolysis	serine-type endopeptidase activity /// serine-type endopeptidase activity /// trypsin;trypsin activity;6.9e-49	---
Cluster 9	152554_at	---	CG31177	---	membrane alanyl aminopeptidase activity	---
Cluster 9	152579_at	Activin Like Protein at 23B	Alp23B	---	transforming growth factor beta receptor binding	---
Cluster 9	152692_at	6-phosphofructo-2-kinase	Pfrx	---	6-phosphofructo-2-kinase activity /// 6-phosphofructo-2-kinase activity /// 6PF2K;catalytic activity;1.4e-114	---
Cluster 9	152759_at	---	CG17549	---	---	---
Cluster 9	152800_at	---	CG13325	---	Acyl_transf_3;transferase activity, transferring groups other than amino-acyl groups;6.3e-05	---
Cluster 9	152827_at	Peptidoglycan recognition protein LB	PGRP-LB	defense response /// immune response /// perception of bacteria	peptidoglycan recognition activity /// peptidoglycan recognition activity /// Amidase_2;N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity;1.6e-63	integral to plasma membrane
Cluster 9	152841_at	---	CG5023	---	actin binding	---
Cluster 9	153019_at	---	ia2	protein amino acid dephosphorylation	protein-tyrosine-phosphatase activity /// transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity /// transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity	plasma membrane
Cluster 9	153069_at	---	CG15096	---	high affinity inorganic phosphate:sodium symporter activity /// sugar_tr;transporter activity;0.0002	---
Cluster 9	153197_at	Ecdysone-induced protein 75B	Eip75B	regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of ecdysteroid metabolism /// molting cycle (sensu Insecta) /// molting cycle (sensu Insecta) /// oogenesis (sensu Insecta) /// ecdysis (sensu Insecta)	specific RNA polymerase II transcription factor activity /// ligand-dependent nuclear receptor activity /// ligand-dependent nuclear receptor activity /// hormone_rec;transcription factor activity;7e-39 /// zf-C4;transcription factor activity;1e-53	nucleus /// nucleus
Cluster 9	153318_at	bubblegum	bgm	---	long-chain-fatty-acid-CoA ligase activity /// AMP-binding;catalytic activity;3.3e-80	---
Cluster 9	153371_at	---	CG3630	---	---	---
Cluster 9	153432_at	Thor	Thor	defense response /// immune response /// immune response /// immune response /// antibacterial humoral response (sensu	eukaryotic initiation factor 4E binding /// eukaryotic initiation factor 4E binding	---

				Invertebrata) /// negative regulation of cell size		
Cluster 9	153434_at	Henna	Hn	phenylalanine catabolism /// eye pigment biosynthesis	phenylalanine 4-monooxygenase activity /// phenylalanine 4-monooxygenase activity /// phenylalanine 4-monooxygenase activity /// tryptophan 5-monooxygenase activity /// ACT;amino acid binding;1.5e-06	---
Cluster 9	153489_at	---	CG11474	---	---	---
Cluster 9	153596_at	Dipeptidase C	Dip-C	---	X-Pro dipeptidase activity /// dipeptidyl-peptidase activity	---
Cluster 9	153672_at	---	CG3587	---	---	---
Cluster 9	153719_at	---	---	---	---	---
Cluster 9	153820_at	---	CG6921	---	---	ELO;integral to membrane;9.2e-10
Cluster 9	153961_at	Cyclin-dependent kinase subunit	Cks	protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation	protein serine/threonine kinase activity /// cyclin-dependent protein kinase activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity	---
Cluster 9	154621_at	---	CG17273	purine nucleotide biosynthesis	adenylosuccinate synthase activity /// adenylosuccinate synthase activity	---
Cluster 9	154740_at	---	CG31793	transport	ATP-binding cassette (ABC) transporter activity	membrane
Cluster 9	154797_at	---	CG13601	---	---	---
Cluster 9	154909_at	Minute (2) 21AB	M(2)21AB	S-adenosylmethionine biosynthesis /// one-carbon compound metabolism	methionine adenosyltransferase activity /// methionine adenosyltransferase activity	---
Cluster 9	154997_at	---	CG15312	---	---	---
Cluster 9	155028_at	---	CG3071	retrograde transport, Golgi to ER	---	COPI vesicle coat
Cluster 9	155037_at	cAMP-dependent protein kinase R1	Pka-R1	actin filament organization /// molting cycle (sensu Insecta) /// oocyte microtubule cytoskeleton polarization /// olfactory learning /// olfactory learning /// cAMP-mediated signaling	cAMP-dependent protein kinase regulator activity /// cAMP-dependent protein kinase regulator activity /// cAMP-dependent protein kinase regulator activity /// cyclic nucleotide binding	cAMP-dependent protein kinase complex /// microtubule cytoskeleton

Top 50 aus SAM

	141527_at	---	Tequila	proteolysis and peptidolysis	serine-type endopeptidase activity /// serine-type endopeptidase activity /// trypsin activity /// pancreatic elastase activity /// CBM_14;chitin binding;0.0029 /// CBM_14;chitin binding;1e-16	---
	142253_at	---	CG10560	---	---	---
	142833_at	---	CG4454	---	---	---
	143298_at	---	CG2150	---	---	---
	143421_at	zerknüllt-related	zen2	dorsal/ventral pattern formation, imaginal disc	RNA polymerase II transcription factor activity	nucleus /// nucleus
	143589_at	Multi drug resistance 50	Mdr50	---	xenobiotic-transporting ATPase activity /// multidrug transporter activity /// multidrug transporter activity	---
	143591_at	TBP-related factor	Trf	transcription initiation from Pol II promoter	general RNA polymerase II transcription factor activity	transcription factor TFIID complex
	143605_at	Drosomycin	Drs	antifungal humoral response (sensu Invertebrata) /// antifungal humoral	antifungal peptide activity /// antifungal peptide activity /// antifungal peptide activity /// antifungal peptide activity ///	---

				response (sensu Invertebrata)	antifungal peptide activity	
	143834_at	heat shock construct of Sigrist	CycB3	cytokinesis after mitosis /// mitotic spindle assembly	cyclin-dependent protein kinase regulator activity	microtubule cytoskeleton
	144064_at	---	Bub1	protein amino acid phosphorylation /// mitotic spindle checkpoint /// mitotic spindle checkpoint /// regulation of exit from mitosis /// regulation of exit from mitosis	protein kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity	kinetochore /// outer kinetochore of condensed chromosome
	144068_at	Immune induced protein 2	IM2	defense response /// defense response	defense/immunity protein activity /// defense/immunity protein activity	extracellular /// extracellular
	146398_at	---	---	---	---	---
	146937_at	Odorant-binding protein 46a	Obp46a	---	odorant binding	---
	146946_s_at	Peroxiredoxin 2540	Prx2540-2	---	peroxidase activity /// antioxidant activity /// antioxidant activity /// non-selenium glutathione peroxidase activity	---
	147084_at	---	CG13159	---	---	---
	147107_at	---	---	---	---	---
	147151_at	---	CG18279	---	---	---
	147430_at	---	CG15066	---	---	---
	147431_at	Immune induced protein 1	IM1	defense response	defense/immunity protein activity	extracellular
	147432_at	---	CG18107	---	---	---
	147433_at	---	CG15067	---	---	---
	147587_at	---	CG15649	---	---	---
	148178_at	---	---	---	---	---
	148620_at	---	CG17826	---	CBM_14;chitin binding;2.3e-10	---
	149046_at	---	---	---	---	---
	149408_at	---	CG1137	---	peptidase activity	---
	149759_at	Glutathione S transferase D5	GstD5	glutathione conjugation reaction	glutathione transferase activity /// glutathione transferase activity	---
	149808_at	---	---	---	---	---
	150087_at	---	CG14324	---	---	---
	150674_at	---	CG14243	---	---	---
	150676_at	---	CG5480	---	---	---
	151209_at	---	CG15065	---	---	---
	151210_at	---	CG16836	---	---	---
	151211_at	---	CG16844	---	---	---
	151217_at	---	---	---	---	---
	151615_at	---	CG7372	---	---	---
	151660_at	swallow	swa	mRNA localization, intracellular /// pole plasm mRNA localization /// bicoid mRNA localization /// bicoid mRNA localization	RNA binding /// RNA binding /// dynein binding	---
	151712_at	---	CG17052	---	structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta) /// CBM_14;chitin binding;3e-14	---
	152266_at	---	CG7448	---	organic cation porter activity	---
	153539_at	---	Gasp	---	chitin binding /// structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta)	---
	153650_at	---	CG5175	---	---	---
	153890_at	pimples	pim	mitotic sister chromatid separation /// mitotic sister chromatid separation	---	---
	153947_at	twine	twe	protein amino acid dephosphorylation /// protein amino acid dephosphorylation /// male meiotic spindle	protein-tyrosine-phosphatase activity /// protein-tyrosine-phosphatase activity /// protein tyrosine/serine/threonine	microtubule cytoskeleton

				assembly (sensu Animalia) /// female meiotic spindle assembly (sensu Animalia) /// male meiosis /// spermatogenesis /// spermatogenesis /// regulation of syncytial blastoderm mitotic cell cycle /// meiotic G2/M1 transition /// meiotic G2/M1 transition /// embryonic morphogenesis	phosphatase activity	
	154015_at	---	CG4060	---	---	---
	154516_at	smaug	smg	negative regulation of translation	translation repressor activity, nucleic acid binding /// RNA binding /// mRNA 3' UTR binding /// protein binding /// translation repressor activity /// translation repressor activity	---
	154659_at	Chromatin assembly factor 1 subunit	Caf1	nucleosome assembly /// DNA replication dependent nucleosome assembly /// chromatin silencing	chromatin binding /// histone-specific chaperone activity /// methyltransferase activity	nucleus /// chromatin assembly complex /// nucleosome remodeling complex
	154706_at	greatwall	gwl	protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation /// mitosis	protein kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity	---
	154815_at	Minichromosome maintenance 7	Mcm7	pre-replicative complex formation and maintenance /// pre-replicative complex formation and maintenance	chromatin binding /// chromatin binding /// MCM;DNA binding;1.2e-297	pre-replicative complex /// pre-replicative complex
	155060_at	---	CG8223	---	---	---
	155082_at	fizzy	fzy	cyclin catabolism		

6.2 Filterergebnisse nach Expressionswertbestimmung mit dem Verfahren von Naef

	FlyBase ID	Name	Symbol	molekulare Funktion	biologischer Prozess	zelluläre Komponente
Auswertung für <i>btl</i>-GAL4; UAS-<i>bnl</i> Embryonen						
a	FBgn0040736	Immune induced protein 3	IM3		defense response	extracellular
a	FBgn0040734		CG15065			
a	FBgn0034819		CG9877			
b	FBgn0040827		CG13315			
c	FBgn0004428	Lysozyme E	LysE	lysozyme activity; GO:0003796 ; EC:3.2.1.17; GO:0003796 ; EC:3.2.1.17	antimicrobial humoral response (sensu Invertebrata); GO:0006960	
c	FBgn0037123		CG14569			
c	FBgn0034294		CG5765			
c	FBgn0033788		CG13323			
c	FBgn0033604		CG9070			
c	FBgn0037179		CG14453			
c	FBgn0036470		CG13463			
c	FBgn0040729		CG15126			
c	FBgn0032069		CG9468	alpha-mannosidase activity; GO:0004559 ; EC:3.2.1.24; hydrolase activity, hydrolyzing N-	carbohydrate metabolism; GO:0005975	lysosome; GO:0005764

				glycosyl compounds; GO:0016799 ; EC:3.2.2.-		
c	FBgn0036469		CG18649			
c	FBgn0028536		CG15281			
d	FBgn0034819		CG9877			
e	FBgn0039203		CG13618			
e	FBgn0032785		CG10026	tocopherol binding; GO:0008431; retinal binding; GO:0016918; carrier activity; GO:0005386	coenzyme and prosthetic group metabolism; GO:0006731; vitamin/cofactor transport; GO:0015875	
e	FBgn0035737		CG8634			
e	FBgn0036594		CG13047			
e	FBgn0035513		CG1259	structural constituent of larval cuticle (sensu Insecta); GO:0008010		
e	FBgn0045828		CG10686			
e	FBgn0015625		CycB3	kinase activator activity; GO:0019209; cyclin- dependent protein kinase regulator activity; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-	regulation of cell cycle; GO:0000074	microtubule cytoskeleton; GO:0015630
e	FBgn0000340	canoe	cno	actin binding; GO:0003779; structural constituent of cytoskeleton; GO:0005200	regulation of JNK cascade; GO:0046328	adherens junction; GO:0005912
e	FBgn0031562		CG3604	serine-type endopeptidase inhibitor activity; GO:0004867		
e	FBgn0011715	Snf5-related 1	Snr1	RNA polymerase II transcription factor activity; GO:0003702; general RNA polymerase II transcription factor activity; GO:0016251	embryonic development (sensu Insecta); GO:0001700; larval/pupal development (sensu Insecta); GO:0002165	brahma complex; GO:0035060; nucleus; GO:0005634
e	FBgn0039113		CG10217			
e	FBgn0037128		CG14572			
e	FBgn0037124		CG14568			
e	FBgn0031560		CG16713	serine-type endopeptidase inhibitor activity; GO:0004867		
e	FBgn0010342	Microtubule- associated protein 60	Map60	microtubule binding; GO:0008017	microtubule-based process; GO:0007017	centrosome; GO:0005813; ; GO:0005813
e	FBgn0031558		CG16704	serine-type endopeptidase inhibitor activity; GO:0004867		
e	FBgn0037636		CG9821			
e	FBgn0039543		CG12428	carnitine O- octanoyltransferase activity; GO:0008458 ; EC:2.3.1.137; acetyltransferase activity; GO:0016407 ; EC:2.3.1.-	amino acid metabolism; GO:0006520	peroxisome; GO:0005777
e	FBgn0027504		CG8878	protein kinase activity; GO:0004672 ; EC:2.7.1.37; protein serine/threonine kinase activity; GO:0004674	protein amino acid phosphorylation; GO:0006468	
e	FBgn0000404	Cyclin A	CycA	kinase activator activity; GO:0019209; cyclin- dependent protein kinase regulator activity; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ;	mitosis; GO:0007067; mitotic sister chromatid separation; GO:0016359	cytoplasm; GO:0005737; ; GO:0005737; nucleus; GO:0005634; ; GO:0005634

				GO:0016538 ; EC:2.7.1.-		
e	FBgn0038074		CG6188	glycine N- methyltransferase activity; GO:0017174 ; EC:2.1.1.20	amino acid biosynthesis; GO:0008652	
e	FBgn0004698	mutagen-sensitive 210	mus210	damaged DNA binding; GO:0003684	nucleotide-excision repair; GO:0006289; ; GO:0006289	nucleus; GO:0005634
e	FBgn0032037		CG13394			
e	FBgn0032947		CG17571	trypsin activity; GO:0004295 ; EC:3.4.21.4; serine- type endopeptidase activity; GO:0004252 ; EC:3.4.21.-	proteolysis and peptidolysis; GO:0006508	

Auswertung der Versuche zur Hypoxieantwort

a	FBgn0035434	drosomycin-5	dro5		defense response; GO:0006952; ; GO:0006952	
b	FBgn0000340	canoe	cno	actin binding; GO:0003779; structural constituent of cytoskeleton; GO:0005200	regulation of JNK cascade; GO:0046328	adherens junction; GO:0005912

k-Means-Gruppierung aus ANOVA

Cluster 6	FBgn0015010	Antigen 5-related	Ag5r		defense response; GO:0006952	extracellular; GO:0005576
Cluster 6	FBgn0033792		CG13325			
Cluster 6	FBgn0039311		CG10513			
Cluster 6	FBgn0036875		CG9449	acid phosphatase activity; GO:0003993 ; EC:3.1.3.2	phosphate metabolism; GO:0006796	
Cluster 6	FBgn0034162		CG6426		defense response; GO:0006952; defense response to bacteria; GO:0042742	
Cluster 6	FBgn0039297		CG11852			
Cluster 6	FBgn0037204		CG11131			
Cluster 6	FBgn0034010		CG8157			
Cluster 6	FBgn0022709	Adenylate kinase-1	Adk1	adenylate kinase activity; GO:0004017 ; EC:2.7.4.3; uridine kinase activity; GO:0004849 ; EC:2.7.1.48	purine base metabolism; GO:0006144; pyrimidine base metabolism; GO:0006206	
Cluster 6	FBgn0001128	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase	Gpdh	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) activity; GO:0004367 ; EC:1.1.1.8; ; GO:0004367 ; EC:1.1.1.8	glycerophosphate shuttle; GO:0006127; lipid metabolism; GO:0006629	cytoplasm; GO:0005737
Cluster 6	FBgn0032283		CG7296			
Cluster 6	FBgn0034583		CG10527	farnesoic acid O- methyltransferase activity; GO:0019010		
Cluster 6	FBgn0003863	alphaTrypsin	alphaTry	trypsin activity; GO:0004295 ; EC:3.4.21.4	proteolysis and peptidolysis; GO:0006508; ; GO:0006508	extracellular; GO:0005576
Cluster 6	FBgn0036030		CG6767	ribose-phosphate diphosphokinase activity; GO:0004749 ; EC:2.7.6.1; nucleotide kinase activity; GO:0019201	purine base metabolism; GO:0006144; pyrimidine base metabolism; GO:0006206	
Cluster 6	FBgn0038347		CG18522	oxidoreductase activity; GO:0016491 ; EC:1.-.-.-	defense response; GO:0006952; nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism;	

					GO:0006139; oxygen and reactive oxygen species metabolism; GO:0006800; purine base metabolism; GO:0006144	
Cluster 6	FBgn0038756		CG4783			
Cluster 6	FBgn0038845		CG10827	alkaline phosphatase activity; GO:0004035 ; EC:3.1.3.1; nucleotide phosphatase activity; GO:0019204	mesoderm development; GO:0007498; skeletal development; GO:0001501	
Cluster 6	FBgn0038009		CG17738			
Cluster 6	FBgn0032284		CG7294			
Cluster 6	FBgn0001208	Henna	Hn	phenylalanine 4- monooxygenase activity; GO:0004505 ; EC:1.14.16.1; ; GO:0004505 ; EC:1.14.16.1; ; GO:0004505 ; EC:1.14.16.1; tryptophan 5- monooxygenase activity; GO:0004510 ; EC:1.14.16.4	eye pigment biosynthesis; GO:0006726; signal transduction; GO:0007165	
Cluster 6	FBgn0050359		CG30359	transporter activity; GO:0005215; hydrolase activity; GO:0016787 ; EC:3.-.-.- ; glucosidase activity; GO:0015926 ; EC:3.2.1.-	carbohydrate metabolism; GO:0005975	
Cluster 6	FBgn0031562		CG3604	serine-type endopeptidase inhibitor activity; GO:0004867		
Cluster 6	FBgn0031387		CG15380			
Cluster 6	FBgn0038130		CG8630	stearoyl-CoA 9- desaturase activity; GO:0004768 ; EC:1.14.19.1	fatty acid metabolism; GO:0006631	
Cluster 6	FBgn0030264		CG1961	5'-nucleotidase activity; GO:0008253 ; EC:3.1.3.5; nucleotide phosphatase activity; GO:0019204; phosphoric diester hydrolase activity; GO:0008081 ; EC:3.1.4.-	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; GO:0006139	
Cluster 6	FBgn0035022		CG11413			
Cluster 6	FBgn0036953		CG17145	structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta); GO:0016490		
Cluster 6	FBgn0034828		CG13545			
Cluster 6	FBgn0037782		CG12813			
Cluster 6	FBgn0034394		CG15096	high affinity inorganic phosphate:sodium symporter activity; GO:0005316	carbohydrate metabolism; GO:0005975; carbohydrate transport; GO:0008643; cation transport; GO:0006812; extracellular transport; GO:0006858; phosphate metabolism; GO:0006796; phosphate transport; GO:0006817	
Cluster 6	FBgn0031418		CG3609	oxidoreductase activity; GO:0016491 ; EC:1.-.-.-		
Cluster 6	FBgn0038180		CG9307	chitinase activity;	polysaccharide	

				GO:0004568 ; EC:3.2.1.14; hydrolase activity, hydrolyzing N- glycosyl compounds; GO:0016799 ; EC:3.2.2.-	metabolism; GO:0005976	
Cluster 6	FBgn0031688		Cyp28d2	electron transporter activity; GO:0005489; ; GO:0005489; oxidoreductase activity; GO:0016491 ; EC:1.-.-.-	steroid metabolism; GO:0008202	membrane; GO:0016020; microsome; GO:0005792
Cluster 6	FBgn0023177	Protein phosphatase 19C	Pp4-19C	protein serine/threonine phosphatase activity; GO:0004722; ; GO:0004722	M-phase specific microtubule process; GO:0000072; microtubule-based process; GO:0007017; regulation of mitotic cell cycle; GO:0007346	centrosome; GO:0005813; cytoplasm; GO:0005737; microtubule cytoskeleton; GO:0015630; nucleus; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0036248		CG17153			
Cluster 9	FBgn0036111		CG6391	diphosphoinositol- polyphosphate diphosphatase activity; GO:0008486 ; EC:3.6.1.52	phospholipid metabolism; GO:0006644	
Cluster 9	FBgn0015625		CycB3	kinase activator activity; GO:0019209; cyclin- dependent protein kinase regulator activity; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-	regulation of cell cycle; GO:0000074	microtubule cytoskeleton; GO:0015630
Cluster 9	FBgn0036522		CG7372	transcription regulator activity; GO:0030528	cell proliferation; GO:0008283; nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; GO:0006139; regulation of transcription from Pol II promoter; GO:0006357; transcription from Pol II promoter; GO:0006366	
Cluster 9	FBgn0051163		CG31163	SH3/SH2 adaptor protein activity; GO:0005070		
Cluster 9	FBgn0010342	Microtubule- associated protein 60	Map60	microtubule binding; GO:0008017	microtubule-based process; GO:0007017	centrosome; GO:0005813; ; GO:0005813
Cluster 9	FBgn0004924	Topoisomerase 1	Top1	DNA topoisomerase type I activity; GO:0003917 ; EC:5.99.1.2; ; GO:0003917 ; EC:5.99.1.2; ; GO:0003917 ; EC:5.99.1.2; nucleic acid binding; GO:0003676	DNA replication; GO:0006260; mRNA transcription; GO:0009299; transcription from Pol II promoter; GO:0006366	cytoplasm; GO:0005737; nucleus; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0014007	Protein tyrosine phosphatase 69D	Ptp69D	receptor signaling protein tyrosine phosphatase activity; GO:0004728; transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity; GO:0005001; protein- tyrosine-phosphatase activity; GO:0004725 ; EC:3.1.3.48; ; GO:0004725 ; EC:3.1.3.48	defasciculation of motor neuron; GO:0007415; motor axon guidance; GO:0008045; protein amino acid dephosphorylation; GO:0006470	plasma membrane; GO:0005886; ; GO:0005886

Cluster 9	FBgn0030318	rhomboid-4	rho-4	serine-type peptidase activity; GO:0008236; receptor binding; GO:0005102; receptor signaling protein activity; GO:0005057	ectoderm development; GO:0007398; female gamete generation; GO:0007292; neurogenesis; GO:0007399	integral to membrane; GO:0016021; plasma membrane; GO:0005886
Cluster 9	FBgn0003716	thickveins	tkv	protein kinase activity; GO:0004672 ; EC:2.7.1.37; type I transforming growth factor beta receptor activity; GO:0005025; ; GO:0005025	anterior/posterior pattern formation, imaginal disc; GO:0007448; dorsal closure; GO:0007391; tracheal system development (sensu Insecta); GO:0007424; transforming growth factor beta receptor signaling pathway; GO:0007179; wing morphogenesis; GO:0007476; ; GO:0007476; ; GO:0007476	plasma membrane; GO:0005886; ; GO:0005886; ; GO:0005886; ; GO:0005886
Cluster 9	FBgn0001086	fizzy	fzy		cyclin catabolism; GO:0008054; proteolysis and peptidolysis; GO:0006508	
Cluster 9	FBgn0032295		CG12299	transcription regulator activity; GO:0030528	cell proliferation; GO:0008283; nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; GO:0006139; regulation of transcription from Pol II promoter; GO:0006357; transcription from Pol II promoter; GO:0006366	
Cluster 9	FBgn0003231	refractory to sigma P	ref(2)P	transcription regulator activity; GO:0030528	viral infectious cycle; GO:0019058	nucleus; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0015320	Ubiquitin conjugating enzyme 2	UbcD2	ubiquitin conjugating enzyme activity; GO:0004840; ; GO:0004840; ; GO:0004840; ; GO:0004840; ; GO:0004840; ; GO:0004840; ligase activity; GO:0016874 ; EC:6.-.-.-	protein metabolism; GO:0019538; ubiquitin cycle; GO:0006512; ; GO:0006512	
Cluster 9	FBgn0025458		Bub1	protein serine/threonine kinase activity; GO:0004674; receptor signaling protein serine/threonine kinase activity; GO:0004702 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0004674; protein kinase activity; GO:0004672 ; EC:2.7.1.37	chromosome segregation; GO:0007059; regulation of exit from mitosis; GO:0007096	kinetochore; GO:0000776; outer kinetochore of condensed chromosome; GO:0000940
Cluster 9	FBgn0016917	Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E	Stat92E	DNA binding; GO:0003677; ; GO:0003677; ; GO:0003677; RNA polymerase II transcription factor activity; GO:0003702; transcription factor activity; GO:0003700; ; GO:0003702	anti-apoptosis; GO:0006916; cellular defense response; GO:0006968; mesoderm development; GO:0007498; regulation of transcription from Pol II promoter;	nucleus; GO:0005634; ; GO:0005634

					GO:0006357; signal transduction; GO:0007165	
Cluster 9	FBgn0035213		CG2199			
Cluster 9	FBgn0030803		CG4880			
Cluster 9	FBgn0002715	meiotic S332	mei-S332	molecular_function unknown; GO:0005554	sister chromatid cohesion; GO:0007062; ; GO:0007062	chromosome; GO:0005694; chromosome, pericentric region; GO:0000775
Cluster 9	FBgn0003612	Suppressor of variegation 2-10	Su(var)2-10	DNA binding; GO:0003677; DEAD/H-box RNA helicase binding; GO:0017151	protein modification; GO:0006464; regulation of transcription from Pol II promoter; GO:0006357	cytoplasm; GO:0005737; nuclear lamina; GO:0005652; nucleoplasm; GO:0005654; nucleus; GO:0005634; polytene chromosome; GO:0005700; polytene chromosome, telomeric region; GO:0035012
Cluster 9	FBgn0011737	wee	wee	protein-tyrosine kinase activity; GO:0004713 ; EC:2.7.1.112; ; GO:0004713 ; EC:2.7.1.112; protein kinase activity; GO:0004672 ; EC:2.7.1.37; non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity; GO:0004715 ; EC:2.7.1.-	mitotic checkpoint; GO:0007093	nucleus; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0020633	Minichromosome maintenance 7	Mcm7	chromatin binding; GO:0003682; ; GO:0003682; DNA replication origin binding; GO:0003688; DNA helicase activity; GO:0003678	pre-replicative complex formation and maintenance; GO:0006267; ; GO:0006267	pre-replicative complex; GO:0005656; ; GO:0005656
Cluster 9	FBgn0038476		CG5175			
Cluster 9	FBgn0000404	Cyclin A	CycA	kinase activator activity; GO:0019209; cyclin-dependent protein kinase regulator activity; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-	mitosis; GO:0007067; mitotic sister chromatid separation; GO:0016359	cytoplasm; GO:0005737; ; GO:0005737; nucleus; GO:0005634; ; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0010300	brain tumor	brat	translation regulator activity; GO:0045182; transcription regulator activity; GO:0030528	cell proliferation; GO:0008283; regulation of transcription from Pol II promoter; GO:0006357; transport; GO:0006810	
Cluster 9	FBgn0030269		CG18292	kinase regulator activity; GO:0019207; kinase inhibitor activity; GO:0019210	cell proliferation; GO:0008283	
Cluster 9	FBgn0036733		CG6322	pre-mRNA splicing factor activity; GO:0008248	RNA splicing; GO:0008380; nuclear mRNA splicing, via spliceosome; GO:0000398; ; GO:0000398	small nuclear ribonucleoprotein complex; GO:0030532; ; GO:0030532; snRNP U4; GO:0005687; snRNP U6; GO:0005688;

						spliceosome complex; GO:0005681
Cluster 9	FBgn0000405	Cyclin B	CycB	kinase activator activity; GO:0019209; cyclin-dependent protein kinase regulator activity; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-	regulation of cell cycle; GO:0000074	nuclear cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex; GO:0019908; pole plasm; GO:0045495
Cluster 9	FBgn0037376		CG2051	histone acetyltransferase activity; GO:0004402 ; EC:2.3.1.48	chromatin assembly/disassembly; GO:0006333	
Cluster 9	FBgn0000996	double parked	dup	DNA binding; GO:0003677	DNA replication; GO:0006260; DNA replication checkpoint; GO:0000076; eggshell formation (sensu Insecta); GO:0007304	cytoplasm; GO:0005737; nuclear origin of replication recognition complex; GO:0005664; nucleus; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0001491	lethal (1) 10Bb	l(1)10Bb	transcription regulator activity; GO:0030528		nucleus; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0000166	bicoid	bcd	specific RNA polymerase II transcription factor activity; GO:0003704; translation regulator activity; GO:0045182; morphogen activity; GO:0016015	determination of anterior/posterior axis, embryo; GO:0008595; ; GO:0008595; maternal determination of anterior/posterior axis, embryo; GO:0008358; ; GO:0008358; negative regulation of translation; GO:0016478; regulation of translation; GO:0006445	nucleus; GO:0005634; ; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0028980	tantalus	tan	molecular_function unknown; GO:0005554	pigmentation; GO:0048066; sensory organ development; GO:0007423	cytoplasm; GO:0005737; nucleus; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0030486		CG1716	transcription cofactor activity; GO:0003712; transcription factor binding; GO:0008134	regulation of transcription from Pol II promoter; GO:0006357	
Cluster 9	FBgn0027544		CG2217			
Cluster 9	FBgn0040066	will die slowly	wds		cell proliferation; GO:0008283	
Cluster 9	FBgn0045828		CG10686			
Cluster 9	FBgn0037446		CG10267	transcription regulator activity; GO:0030528	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism; GO:0006139; regulation of transcription from Pol II promoter; GO:0006357; transcription from Pol II promoter; GO:0006366	
Cluster 9	FBgn0004655	wings apart-like	wapl		female meiosis chromosome segregation; GO:0016321; sister chromatid cohesion; GO:0007062	
Cluster 9	FBgn0024987		CG3056	RNA binding; GO:0003723; pre-mRNA splicing factor	cell proliferation; GO:0008283; histone mRNA 3'-end	

				activity; GO:0008248	processing; GO:0006398; nuclear mRNA splicing, via spliceosome; GO:0000398; sex determination; GO:0007530	
Cluster 9	FBgn0042185		CG18769			
Cluster 9	FBgn0000340	canoe	cno	actin binding; GO:0003779; structural constituent of cytoskeleton; GO:0005200	regulation of JNK cascade; GO:0046328	adherens junction; GO:0005912
Cluster 9	FBgn0022338	deoxyribonucleoside kinase	dnk	deoxynucleoside kinase activity; GO:0019136 ; EC:2.7.1.145; thymidine kinase activity; GO:0004797 ; EC:2.7.1.21; ; GO:0019136 ; EC:2.7.1.145; nucleotide kinase activity; GO:0019201	TMP biosynthesis; GO:0006230; nucleoside diphosphate phosphorylation; GO:0006165; ; GO:0006165; ; GO:0006165; pyrimidine base metabolism; GO:0006206	cellular_component unknown; GO:0008372; mitochondrion; GO:0005739
Cluster 9	FBgn0031456	Transportin- Serine/Arginine rich	Trn-SR	protein binding; GO:0005515; ; GO:0005515; ; GO:0005515; ; GO:0005515; ; GO:0005515; transporter activity; GO:0005215	mRNA-nucleus export; GO:0006406; protein-nucleus import; GO:0006606; ; GO:0006606; regulation of nuclear mRNA splicing, via spliceosome; GO:0048024; ; GO:0048024; ; GO:0048024; ; GO:0048024; ; GO:0048024; splicing factor protein- nucleus import; GO:0035048; ; GO:0035048; ; GO:0035048; ; GO:0035048; ; GO:0035048; ; GO:0035048	cytoplasm; GO:0005737; nucleus; GO:0005634
Cluster 9	FBgn0010287	TBP-related factor	Trf	general RNA polymerase II transcription factor activity; GO:0016251; ; GO:0016251; ; GO:0016251; ; GO:0016251; ; GO:0016251; ; GO:0016251; ; GO:0016251	transcription initiation from Pol II promoter; GO:0006367; ; GO:0006367; ; GO:0006367; ; GO:0006367; ; GO:0006367; ; GO:0006367; ; GO:0006367	transcription factor TFIID complex; GO:0005669; ; GO:0005669; ; GO:0005669; ; GO:0005669; ; GO:0005669; ; GO:0005669; ; GO:0005669
Cluster 9	FBgn0035027		CG3511	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; GO:0003755 ; EC:5.2.1.8	defense response; GO:0006952; protein folding; GO:0006457; protein targeting; GO:0006605	
Cluster 9	FBgn0026597	Axin	Axn	beta-catenin binding; GO:0008013	Wnt receptor signaling pathway; GO:0016055; ; GO:0016055	cytoplasm; GO:0005737
Cluster 9	FBgn0036272		CG4300	spermidine synthase activity; GO:0004766 ; EC:2.5.1.16		
Cluster 9	FBgn0026316	Ubiquitin conjugating enzyme 10	UbcD10	ubiquitin conjugating enzyme activity; GO:0004840; ; GO:0004840; ligase activity; GO:0016874 ; EC:6.-.-.-	protein metabolism; GO:0019538; ubiquitin cycle; GO:0006512	
Cluster 9	FBgn0039113		CG10217			
Cluster 12	FBgn0020642		Lcp65Ac	structural constituent of		

				larval cuticle (sensu Insecta); GO:0008010; ; GO:0008010		
Cluster 12	FBgn0038528		CG14326			
Cluster 12	FBgn0039872		CG2196	sodium:iodide symporter activity; GO:0008507; cation transporter activity; GO:0008324	cation transport; GO:0006812; coenzyme and prosthetic group metabolism; GO:0006731; extracellular transport; GO:0006858; vitamin/cofactor transport; GO:0015875	
Cluster 12	FBgn0052568		CG32568	protein phosphatase type 2A regulator activity; GO:0008601	intracellular signaling cascade; GO:0007242; protein amino acid dephosphorylation; GO:0006470	
Cluster 12	FBgn0023541		Cyp4d14	electron transporter activity; GO:0005489; ; GO:0005489; oxidoreductase activity; GO:0016491 ; EC:1.-.-.-		membrane; GO:0016020; microsome; GO:0005792
Cluster 12	FBgn0050265		CG30265	transporter activity; GO:0005215	carbohydrate metabolism; GO:0005975; carbohydrate transport; GO:0008643; cation transport; GO:0006812; extracellular transport; GO:0006858; ion transport; GO:0006811; phosphate metabolism; GO:0006796; phosphate transport; GO:0006817; transport; GO:0006810	
Cluster 12	FBgn0053178		CG33178	transferase activity; GO:0016740 ; EC:2.-.-.-	defense response; GO:0006952; protein metabolism; GO:0019538; protein modification; GO:0006464; response to toxin; GO:0009636	
Cluster 12	FBgn0038613		CG7678	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism; GO:0008553 ; EC:3.6.3.6	cation transport; GO:0006812	hydrogen-transporting ATPase V0 domain; GO:0000220
Cluster 12	FBgn0039208		CG6643			
Cluster 12	FBgn0038986		CG5278	acyltransferase activity; GO:0008415 ; EC:2.3.1.-; transferase activity; GO:0016740 ; EC:2.-.-.-	fatty acid metabolism; GO:0006631; lipid metabolism; GO:0006629	
Cluster 12	FBgn0036878		CG9283	structural constituent of adult cuticle (sensu Insecta); GO:0008012		
Cluster 12	FBgn0033931	Odorant-binding protein 50e	Obp50e	odorant binding; GO:0005549		
Cluster 12	FBgn0052237		CG32237			
Cluster 12	FBgn0033124	Tetraspanin 42Ec	Tsp42Ec			integral to membrane; GO:0016021
Cluster 12	FBgn0039045		CG17119	L-cystine transporter activity; GO:0015184	L-cystine transport; GO:0015811	lysosomal membrane; GO:0005765

Cluster 12	FBgn0032948		CG17570			
Cluster 12	FBgn0030593		CG9512	choline dehydrogenase activity; GO:0008812 ; EC:1.1.99.1		
Cluster 12	FBgn0031089		CG9572			
Cluster 12	FBgn0034885		CG4019	water channel activity; GO:0015250; carrier activity; GO:0005386	cell homeostasis; GO:0019725; transport; GO:0006810	
Cluster 12	FBgn0035813		CG8492	lysozyme activity; GO:0003796 ; EC:3.2.1.17; ; GO:0003796 ; EC:3.2.1.17	antimicrobial humoral response (sensu Invertebrata); GO:0006960	
Cluster 12	FBgn0030695	Peptidoglycan recognition protein LE	PGRP-LE	peptidoglycan recognition activity; GO:0016019; ; GO:0016019; ; GO:0016019; receptor activity; GO:0004872	defense response; GO:0006952; immune response; GO:0006955	integral to plasma membrane; GO:0005887
Cluster 12	FBgn0002571	Larval visceral protein L	LvpL	alpha-glucosidase activity; GO:0004558 ; EC:3.2.1.20; ; GO:0004558 ; EC:3.2.1.20; ; GO:0004558 ; EC:3.2.1.20; transporter activity; GO:0005215	glucose metabolism; GO:0006006	
Cluster 12	FBgn0050035		CG30035	glucose transporter activity; GO:0005355	carbohydrate metabolism; GO:0005975; carbohydrate transport; GO:0008643	integral to membrane; GO:0016021
Cluster 12	FBgn0036264		CG11529	chymotrypsin activity; GO:0004263 ; EC:3.4.21.1; serine-type endopeptidase activity; GO:0004252 ; EC:3.4.21.-	proteolysis and peptidolysis; GO:0006508	
Cluster 12	FBgn0028658		adat	tRNA specific adenosine deaminase activity; GO:0008251; ; GO:0008251; ; GO:0008251	purine base metabolism; GO:0006144	
Cluster 12	FBgn0038527		CG14324			
Cluster 12	FBgn0040732		CG16926			
Cluster 12	FBgn0038942		CG13862			
Cluster 12	FBgn0039326		CG10562			
Cluster 12	FBgn0031087		CG12656			
Cluster 12	FBgn0030309		CG1572			
Cluster 12	FBgn0011822	pepsinogen-like	pcl	cathepsin E activity; GO:0004193 ; EC:3.4.23.34	proteolysis and peptidolysis; GO:0006508	
Cluster 12	FBgn0010041	Glutathione S transferase D5	GstD5	glutathione transferase activity; GO:0004364 ; EC:2.5.1.18; ; GO:0004364 ; EC:2.5.1.18		
Cluster 12	FBgn0040723		CG5011			
Cluster 12	FBgn0039873		CG2191	sodium dependent multivitamin transporter activity; GO:0008523; cation transporter activity; GO:0008324	cation transport; GO:0006812; coenzyme and prosthetic group metabolism; GO:0006731; extracellular transport; GO:0006858; vitamin/cofactor transport; GO:0015875	
Cluster 12	FBgn0040566		CG14328			
Cluster 12	FBgn0033589		CG13227			
Cluster 12	FBgn0033968		CG10200			
Cluster 12	FBgn0039051		CG17109	NOT aminoacylase		

				activity;		
Cluster 14	FBgn0038132		CG15887			
Cluster 14	FBgn0034429		CG18607			
Cluster 14	FBgn0039719		CG15515			
Cluster 14	FBgn0034709		CG3074	cathepsin B activity; GO:0004213 ; EC:3.4.22.1	protein metabolism; GO:0019538	
Cluster 14	FBgn0037179		CG14453			
Cluster 14	FBgn0031580		CG15423			
Cluster 14	FBgn0035779		CG8562	metallocarboxypeptidase activity; GO:0004181 ; EC:3.4.17.-	proteolysis and peptidolysis; GO:0006508	
Cluster 14	FBgn0035917		CG6416		mesoderm development; GO:0007498	
Cluster 14	FBgn0034664		CG4377			
Cluster 14	FBgn0036363		CG10140			
Cluster 14	FBgn0030537		CG12480			
Cluster 14	FBgn0040553		CG14374			
Cluster 14	FBgn0010043	Glutathione S transferase D7	GstD7	glutathione transferase activity; GO:0004364 ; EC:2.5.1.18; ; GO:0004364 ; EC:2.5.1.18	defense response; GO:0006952; response to toxin; GO:0009636	
Cluster 14	FBgn0031563		CG10031	protease inhibitor activity; GO:0030414		
Cluster 14	FBgn0030929		CG15043			
Cluster 14	FBgn0027556		CG4928		muscle contraction; GO:0006936	
Cluster 14	FBgn0034296		CG10912			
Cluster 14	FBgn0035781		CG8560	NOT carboxypeptidase activity; GO:0004180		
Cluster 14	FBgn0036951		CG7017	structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta); GO:0016490		
Cluster 14	FBgn0038873		CG5892			
Cluster 14	FBgn0027073		CG4302	UDP- glycosyltransferase activity; GO:0008194	defense response; GO:0006952; polysaccharide metabolism; GO:0005976; response to toxin; GO:0009636	
Cluster 14	FBgn0040393		CG14265			
Cluster 14	FBgn0036362		CG10725	structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta); GO:0016490		
Cluster 14	FBgn0039475		CG6277	triacylglycerol lipase activity; GO:0004806 ; EC:3.1.1.3	lipid metabolism; GO:0006629	
Cluster 14	FBgn0038774		CG5023	actin binding; GO:0003779; ; GO:0003779; structural constituent of cytoskeleton; GO:0005200	muscle contraction; GO:0006936	
Cluster 14	FBgn0035582		CG13705			
Cluster 14	FBgn0035985		CG3672			
Cluster 14	FBgn0031579		CG15422			
Cluster 14	FBgn0011555	thetaTrypsin	thetaTry	trypsin activity; GO:0004295 ; EC:3.4.21.4; ; GO:0004295 ; EC:3.4.21.4	proteolysis and peptidolysis; GO:0006508; ; GO:0006508	extracellular; GO:0005576
Cluster 14	FBgn0034275		CG5002	high affinity sulfate permease activity; GO:0015381	anion transport; GO:0006820; extracellular transport; GO:0006858; sulfur metabolism; GO:0006790	
Cluster 15	FBgn0034819		CG9877			

Cluster 15	FBgn0031558		CG16704	serine-type endopeptidase inhibitor activity; GO:0004867		
Cluster 15	FBgn0028469		CG8062	monocarboxylic acid transporter activity; GO:0008028		
Cluster 15	FBgn0036589		CG13067			
Cluster 15	FBgn0037724	Frost	Fst		response to cold; GO:0009409; ; GO:0009409	
Cluster 15	FBgn0037128		CG14572			
Cluster 15	FBgn0027571		CG3523	fatty-acid synthase activity; GO:0004312 ; EC:2.3.1.85	fatty acid biosynthesis; GO:0006633	
Cluster 15	FBgn0031000		CG7876			
Cluster 15	FBgn0038148		CG14377			
Cluster 15	FBgn0037996		CG4830	long-chain fatty acid transporter activity; GO:0005324; ligase activity; GO:0016874 ; EC:6.-.-.-		
Cluster 15	FBgn0029865		CG15893			
Cluster 15	FBgn0037124		CG14568			
Cluster 15	FBgn0038257	Senescence marker protein-30	smp-30	calcium ion binding; GO:0005509	anterior/posterior axis specification; GO:0009948; calcium-mediated signaling; GO:0019722; development; GO:0007275; intracellular signaling cascade; GO:0007242; signal transduction; GO:0007165	
Cluster 15	FBgn0038074		CG6188	glycine N-methyltransferase activity; GO:0017174 ; EC:2.1.1.20	amino acid biosynthesis; GO:0008652	
Cluster 15	FBgn0032282		CG7299			
Cluster 15	FBgn0011705	rolling stone	rost		mesoderm development; GO:0007498; myoblast fusion; GO:0007520	integral to membrane; GO:0016021; plasma membrane; GO:0005886; ; GO:0005886
Cluster 15	FBgn0031561		CG16712	serine-type endopeptidase inhibitor activity; GO:0004867		
Cluster 15	FBgn0003060		CG9757			
Cluster 15	FBgn0035544		CG15021			
Cluster 15	FBgn0037129		CG14565			
Cluster 15	FBgn0029155		Mdh	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP+) activity; GO:0004473 ; EC:1.1.1.40; ; GO:0004473 ; EC:1.1.1.40; carboxy-lyase activity; GO:0016831 ; EC:4.1.1.-	malate metabolism; GO:0006108; pyruvate metabolism; GO:0006090; tricarboxylic acid cycle; GO:0006099	mitochondrion; GO:0005739
Cluster 15	FBgn0039453		CG6403			
Cluster 15	FBgn0037123		CG14569			
Cluster 15	FBgn0002570	Larval visceral protein H	LvpH	alpha-glucosidase activity; GO:0004558 ; EC:3.2.1.20; ; GO:0004558 ; EC:3.2.1.20; ; GO:0004558 ; EC:3.2.1.20	glucose metabolism; GO:0006006	
Cluster 15	FBgn0031560		CG16713	serine-type endopeptidase inhibitor activity; GO:0004867		
Cluster 15	FBgn0036766		CG5506			

Cluster 15	FBgn0040609		CG3348			
Cluster 15	FBgn0016070	smaug	smg	RNA binding; GO:0003723; protein binding; GO:0005515; translation repressor activity, nucleic acid binding; GO:0000900; translation repressor activity; GO:0030371; mRNA 3' UTR binding; GO:0003730; ; GO:0030371	negative regulation of translation; GO:0016478; ; GO:0016478; ; GO:0016478; ; GO:0016478	
Cluster 15	FBgn0029092		ced-6	receptor binding; GO:0005102	MAPKKK cascade; GO:0000165; apoptosis; GO:0006915; cell surface receptor linked signal transduction; GO:0007166; defense response; GO:0006952; intracellular signaling cascade; GO:0007242; signal transduction; GO:0007165; transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway; GO:0007169	
Cluster 15	FBgn0032037		CG13394			
Cluster 15	FBgn0003087	pimples	pim		mitotic sister chromatid separation; GO:0016359; ; GO:0016359	

Top 50 aus SAM

	FBgn0025583	Immune induced molecule 2	IM2		defense response; GO:0006952; ; GO:0006952	extracellular; GO:0005576; ; GO:0005576
	FBgn0034329	Immune induced molecule 1	IM1		defense response; GO:0006952	extracellular; GO:0005576
	FBgn0040734		CG15065			
	FBgn0040653	Immune induced molecule 4	IM4		defense response; GO:0006952; immune response; GO:0006955	extracellular; GO:0005576
	FBgn0040733		CG15068			
	FBgn0016070	smaug	smg	RNA binding; GO:0003723; protein binding; GO:0005515; translation repressor activity, nucleic acid binding; GO:0000900; translation repressor activity; GO:0030371; mRNA 3' UTR binding; GO:0003730; ; GO:0030371	negative regulation of translation; GO:0016478; ; GO:0016478; ; GO:0016478; ; GO:0016478	
	FBgn0031688		Cyp28d2	electron transporter activity; GO:0005489; ; GO:0005489; oxidoreductase activity; GO:0016491 ; EC:1.-.-.-	steroid metabolism; GO:0008202	membrane; GO:0016020; microsome; GO:0005792
	FBgn0033835	Immune induced molecule 10	IM10		defense response; GO:0006952	extracellular; GO:0005576
	FBgn0050101		CG30101			
	FBgn0040735		CG16836			
	FBgn0039444		CG14243			
	FBgn0003065		CG2150			
	FBgn0035547		CG15022			
	FBgn0026077		Gasp	chitin binding; GO:0008061; structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta);		

				GO:0016490		
	FBgn0038487		CG4060			
	FBgn0033518	Peroxiredoxin 2540	Prx2540-2	peroxidase activity; GO:0004601 ; EC:1.11.1.7; antioxidant activity; GO:0016209; ; GO:0016209; non-selenium glutathione peroxidase activity; GO:0016224 ; EC:1.11.1.-; ; GO:0016209; ; GO:0016224 ; EC:1.11.1.-	defense response; GO:0006952; oxygen and reactive oxygen species metabolism; GO:0006800	
	FBgn0037129		CG14565			
	FBgn0010381	Drosomycin	Drs		defense response; GO:0006952; defense response to fungi; GO:0050832; ; GO:0050832	extracellular; GO:0005576
	FBgn0040992		CG10570			
	FBgn0032299		CG17127			
	FBgn0040736	Immune induced molecule 3	IM3		defense response; GO:0006952	extracellular; GO:0005576
	FBgn0003087	pimples	pim		mitotic sister chromatid separation; GO:0016359; ; GO:0016359	
	FBgn0003863	alphaTrypsin	alphaTry	trypsin activity; GO:0004295 ; EC:3.4.21.4	proteolysis and peptidolysis; GO:0006508; ; GO:0006508	extracellular; GO:0005576
	FBgn0033721		CG13159			
	FBgn0038148		CG14377			
	FBgn0033307		CG14752			
	FBgn0031097		CG17052	structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta); GO:0016490		
	FBgn0033519		CG11825			
	FBgn0033589		CG13227			
	FBgn0039475		CG6277	triacylglycerol lipase activity; GO:0004806 ; EC:3.1.1.3	lipid metabolism; GO:0006629	
	FBgn0039297		CG11852			
	FBgn0020633	Minichromosome maintenance 7	Mcm7	chromatin binding; GO:0003682; ; GO:0003682; DNA replication origin binding; GO:0003688; DNA helicase activity; GO:0003678	pre-replicative complex formation and maintenance; GO:0006267; ; GO:0006267	pre-replicative complex; GO:0005656; ; GO:0005656
	FBgn0036108		CG7941	structural constituent of larval cuticle (sensu Insecta); GO:0008010		
	FBgn0034330		CG18107			
	FBgn0035736		CG8638	structural constituent of cuticle (sensu Insecta); GO:0005214		
	FBgn0000405	Cyclin B	CycB	kinase activator activity; GO:0019209; cyclin-dependent protein kinase regulator activity; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-	regulation of cell cycle; GO:0000074	nuclear cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex; GO:0019908; pole plasm; GO:0045495
	FBgn0038180		CG9307	chitinase activity; GO:0004568 ; EC:3.2.1.14; hydrolase activity, hydrolyzing N-glycosyl compounds; GO:0016799 ;	polysaccharide metabolism; GO:0005976	

				EC:3.2.2.-		
	FBgn0030390		CG15731			
	FBgn0015037	Cytochrome P450-4p1	Cyp4p1	electron transporter activity; GO:0005489; ; GO:0005489; oxidoreductase activity; GO:0016491 ; EC:1.-.-.-	steroid metabolism; GO:0008202	membrane; GO:0016020; microsome; GO:0005792
	FBgn0039446		CG5480			
	FBgn0038476		CG5175			
	FBgn0034512		CG18067			
	FBgn0002715	meiotic S332	mei-S332	molecular_function unknown; GO:0005554	sister chromatid cohesion; GO:0007062; ; GO:0007062	chromosome; GO:0005694; chromosome, pericentric region; GO:0000775
	FBgn0035685		CG13297			
	FBgn0030803		CG4880			
	FBgn0033942		CG10112			
	FBgn0000404	Cyclin A	CycA	kinase activator activity; GO:0019209; cyclin-dependent protein kinase regulator activity; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-; ; GO:0016538 ; EC:2.7.1.-	mitosis; GO:0007067; mitotic sister chromatid separation; GO:0016359	cytoplasm; GO:0005737; ; GO:0005737; nucleus; GO:0005634; ; GO:0005634
	FBgn0033275		CG14756			
	FBgn0033367		CG8193	monophenol monooxygenase activity; GO:0004503 ; EC:1.14.18.1; ; GO:0004503 ; EC:1.14.18.1	defense response; GO:0006952	

6.3 Gemeinsame Kandidaten aus der SAM-Analyse

Probeset	Name	Symbol	biologischer Prozess	molekulare Funktion	zelluläre Komponente
141323_at	CG10200	---	---	---	---
141379_at	Ag5r	Antigen 5-related	---	---	extracellular
141410_at	CG9307	---	---	chitinase activity /// Glyco_hydro_18;hydrolase activity;2.5e-141	---
141764_at	CG6322	---	mRNA splicing /// RNA splicing	pre-mRNA splicing factor activity	spliceosome complex /// snRNP U4 /// snRNP U6 /// small nuclear ribonucleoprotein complex
142544_at	CG7372	---	---	---	---
142838_at	bcd	bicoid	regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription from Pol II promoter /// regulation of translation /// maternal determination of anterior/posterior axis, embryo /// maternal determination of anterior/posterior axis, embryo /// determination of anterior/posterior axis, embryo /// determination of anterior/posterior axis, embryo /// negative regulation of translation	specific RNA polymerase II transcription factor activity /// morphogen activity /// translation regulator activity /// homeobox;transcription factor activity;3.7e-24	nucleus

142924_at	wee	wee	protein amino acid phosphorylation /// regulation of mitosis /// mitotic checkpoint	protein kinase activity /// protein-tyrosine kinase activity /// protein-tyrosine kinase activity	nucleus
143538_at	Top1	Topoisomerase 1	larval development (sensu Insecta) /// female gamete generation /// embryonic morphogenesis	DNA topoisomerase type I activity /// DNA topoisomerase type I activity /// DNA topoisomerase type I activity /// Topoisomerase I_N;DNA binding;1.3e-154	nucleus /// cytoplasm
143834_at	CycB3	heat shock construct of Sigris	cytokinesis after mitosis /// mitotic spindle assembly	cyclin-dependent protein kinase regulator activity	microtubule cytoskeleton
143976_at	Pp4-19C	Protein phosphatase 19C	M-phase specific microtubule process /// protein amino acid dephosphorylation /// protein amino acid dephosphorylation /// microtubule-based process /// regulation of mitotic cell cycle	protein serine/threonine phosphatase activity /// protein serine/threonine phosphatase activity /// 3.1.3.16;CTD phosphatase activity;6.28e-119 /// Metallophosphatase activity;8.8e-44	nucleus /// cytoplasm /// centrosome /// microtubule cytoskeleton
144064_at	Bub1	---	protein amino acid phosphorylation /// mitotic spindle checkpoint /// mitotic spindle checkpoint /// regulation of exit from mitosis /// regulation of exit from mitosis	protein kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity /// protein serine/threonine kinase activity	kinetochore /// outer kinetochore of condensed chromosome
145412_at	CG12656	---	---	---	---
145414_at	CG9572	---	---	---	---
145637_at	CG3609	---	---	GFO_IDH_MocA;oxidoreductase activity;2.1e-27	---
145728_at	CG16704	---	---	serine-type endopeptidase inhibitor activity	---
145732_at	CG3604	---	---	serine-type endopeptidase inhibitor activity	---
145744_at	CG15423	---	---	---	---
145813_at	Cyp28d2	---	p450;electron transport;4.3e-61	cytochrome P450 activity /// cytochrome P450 activity	microsome /// membrane
146182_at	CG7296	---	---	---	---
146183_at	CG7294	---	---	---	---
146588_at	CG17570	---	---	---	---
146707_at	Tsp42Ec	Tetraspanin 42Ec	---	---	integral to membrane
146987_at	CG13227	---	---	---	---
147027_at	CG30035	---	carbohydrate transport	glucose transporter activity /// sugar_tr;transporter activity;6.4e-99	integral to membrane
147028_i_at	CG30035	---	carbohydrate transport	glucose transporter activity /// sugar_tr;transporter activity;6.4e-99	integral to membrane
147029_s_at	CG30035	---	carbohydrate transport	glucose transporter activity /// sugar_tr;transporter activity;6.4e-99	integral to membrane
147242_at	CG8157	---	---	---	---
147336_at	CG6426	---	---	---	---
147749_at	CG13545	---	---	---	---
147793_at	CG4019	---	---	water channel activity /// MIP;transporter activity;5.8e-48	---
147871_at	CG11413	---	---	---	---
148202_at	CG32237	---	---	---	---
148203_at	CG32237	---	---	---	---
148484_at	CG6767	---	Pribosyltran;nucleoside	ribose-phosphate	---

			metabolism;6.8e-38	diphosphokinase activity	
148640_at	CG11529	---	proteolysis and peptidolysis	serine-type endopeptidase activity /// chymotrypsin activity /// trypsin;trypsin activity;5.9e-58	---
149052_at	CG9449	---	---	acid phosphatase activity	---
149102_at	CG17145	---	---	structural constituent of peritrophic membrane (sensu Insecta) /// CBM_14;chitin binding;0.061	---
149747_at	CG17738	---	---	---	---
149759_at	GstD5	Glutathione S transferase D5	glutathione conjugation reaction	glutathione transferase activity /// glutathione transferase activity	---
150087_at	CG14324	---	---	---	---
150088_at	CG14326	---	---	---	---
150306_at	CG5892	---	---	Acyl_transf_3;transferase activity, transferring groups other than amino-acyl groups;3.6e-05	---
150417_at	CG17119	---	L-cystine transport	L-cystine transporter activity	lysosomal membrane
150423_at	CG17109	---	---	aminoacylase activity /// Peptidase_M20;metallopeptidase activity;1.5e-92	---
150565_at	CG11852	---	---	---	---
150955_at	CG2191	---	---	sodium dependent multivitamin transporter activity /// SSF;transporter activity;1.2e-08	---
151040_f_at	CG14374	---	---	---	---
151615_at	CG7372	---	---	---	---
152286_at	CG4928	---	---	---	---
152457_at	CG3672	---	---	---	---
152513_at	CG10513	---	---	---	---
152800_at	CG13325	---	---	Acyl_transf_3;transferase activity, transferring groups other than amino-acyl groups;6.3e-05	---
152841_at	CG5023	---	---	actin binding	---
153069_at	CG15096	---	---	high affinity inorganic phosphate:sodium symporter activity /// sugar_tr;transporter activity;0.0002	---
153434_at	Hn	Henna	phenylalanine catabolism /// eye pigment biosynthesis	phenylalanine 4-monooxygenase activity /// phenylalanine 4-monooxygenase activity /// phenylalanine 4-monooxygenase activity /// tryptophan 5-monooxygenase activity /// ACT;amino acid binding;1.5e-06	---
153480_at	Map60	Microtubule-associated protein 60	microtubule-based process	microtubule binding	centrosome /// centrosome /// centrosome /// microtubule associated complex /// microtubule associated complex
153650_at	CG5175	---	---	---	---
153983_at	CG4880	---	---	---	---

154177_at	CycB	Cyclin B	G2/M transition of mitotic cell cycle /// mitotic anaphase B /// cytokinesis after mitosis /// cytokinesis /// mitotic chromosome movement /// microtubule/kinetochore interaction	cyclin-dependent protein kinase regulator activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity	nuclear cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex /// pole plasm
154361_at	CG18769	---	---	---	---
154412_at	Su(var)2-10	Suppressor of variegation 2-10	chromosome organization and biogenesis (sensu Eukarya) /// chromosome organization and biogenesis (sensu Eukarya) /// imaginal disc growth /// eye morphogenesis (sensu Drosophila) /// eye morphogenesis (sensu Drosophila) /// chromosome condensation /// regulation of protein catabolism /// regulation of JAK-STAT cascade	DNA binding /// DEAD/H-box RNA helicase binding	chromosome, telomeric region /// nucleus /// nucleus /// nuclear lamina /// nucleoplasm /// nucleoplasm /// polytene chromosome /// cytoplasm /// cytoplasm /// cytoplasm
154599_at	CG2199	---	---	---	---
154815_at	Mcm7	Minichromosome maintenance 7	pre-replicative complex formation and maintenance /// pre-replicative complex formation and maintenance	chromatin binding /// chromatin binding /// MCM;DNA binding;1.2e-297	pre-replicative complex /// pre-replicative complex
155068_at	CycA	Cyclin A	G2/M transition of mitotic cell cycle /// mitosis /// mitosis /// regulation of mitosis /// peripheral nervous system development /// mitotic sister chromatid separation /// negative regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	cyclin-dependent protein kinase regulator activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity /// cyclin-dependent protein kinase regulator activity	nucleus /// cytoplasm /// nuclear cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex /// fusome /// spectrosome
155082_at	fzy	fizzy	cyclin catabolism	---	---

7 Zusammenfassung

Das Blutgefäßsystem der Vertebraten, die Lunge und die Nieren bestehen aus hochkomplexen Netzwerken weitverzweigter epithelialer Röhrensysteme. Die Embryonalentwicklung der Tracheen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* stellt ein hervorragendes Modell für genetische und molekulare Analysen der Verzweigungsmorphogenese dar. Durch die Arbeiten vieler Laboratorien konnten BRANCHLESS (BNL, ein Homolog des Fibroblastenwachstumsfaktors) und BREATHLESS (BTL, sein Rezeptor) als essentielle Faktoren für viele Schritte in der Entwicklung des Tracheensystems identifiziert werden. Die Zielgene der BNL/BTL-Signalkaskade waren bisher zumeist unbekannt.

Die Missexpression des Gens *bnl* resultiert in spezifischen trachealen Phänotypen, die zu larvaler Letalität führen. Für die vorliegende Arbeit wurden Embryonen nach Verlust von BNL-Aktivität als auch solche nach gewebespezifischer trachealer Überexpression von BNL morphologisch und physiologisch charakterisiert. Ebenso wurden Transkriptionsprofile für die funktionell-genomische Analyse erstellt. Interessanterweise induziert die Überexpression in fast allen Tracheenzellen die Terminalzellidentität, die im Wildtyp auf wenige tracheale Zellen beschränkt ist. Obgleich das Tracheensystem somit hauptsächlich aus Zellen besteht, welche auf die direkte Versorgung von Zielgeweben mit Sauerstoff spezialisiert sind, ist dieses System nicht funktionsfähig, wie optophysiologische Studien zeigen konnten.

Idealerweise werden Transkriptomanalysen mit homogenen Zellpopulationen durchgeführt, und nicht mit sich entwickelnden Embryonen, wie es in der vorliegenden Studie technisch notwendig war. Ein direkter Listenvergleich der Transkriptionsprofile von Wildtypembryonen mit Embryonen nach Verlust der BNL-Aktivität oder Überexpression von BNL war daher nicht durchführbar, um BNL-abhängige Gene der Tracheogenese zu identifizieren. Erst durch bioinformatische Methoden und Programme, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu entwickelt wurden, konnten die Messdaten auf die chromosomale Lokalisation, funktionelle *Gene Ontology*-Annotation und auf Graphen genetischer und biochemischer Interaktion abgebildet werden.

Es wurden damit bisher unbekannte Gene identifiziert, die von BNL abhängig sind und deren tracheale Expression durch *in situ*-Hybridisierung validiert werden konnte. Ebenso war es möglich, durch die Projektion der Messdaten auf genetische Interaktionsgraphen putative Wechselwirkungen der BNL/BTL-Signalkaskade mit anderen Signalwegen aufzuzeigen, und eventuelle Aktivierungsmechanismen beispielsweise für unter Überexpression von BNL auftretende Immunfaktoren zu erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass der Signalweg über Stickstoffmonoxid von BNL unabhängig in den Tracheen agiert, wohingegen sich eine Interaktion mit der JAK/STAT-Signalkaskade andeutet.